THESES

présentées à

LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

pour l'obtention du titre

de DOCTEUR de l'UNIVERSITE

de PARIS

(mention Sciences)

PAR

AKIRA SETO

1re THESE : ETUDE SUR L'ALLOTYPIE COMPAREE DES IgG ET DES IgM DU LAPIN

2me THESE : SYNTHESE DES IMMUNOGLOBULINES PAR DES MYELOMES IN VITRO

SOUTENUES LE 30 AVRIL 1970 DEVANT LA COMMISSION COMPOSEE DE :

PRESIDENT	M. CHAPEVILLE
EXAMINATEURS	M. DUBERT
	M. PARAF
INVITE	M. OUDIN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551621_0027

THESES

présentées à

LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

pour l'obtention du titre

de DOCTEUR de l'UNIVERSITE

de PARIS

(mention Sciences)

PAR

AKIRA SETO

1re THESE : ETUDE SUR L'ALLOTYPIE COMPAREE DES IgG ET DES IgM DU LAPIN

2me THESE : SYNTHESE DES IMMUNOGLOBULINES PAR DES MYELOMES IN VITRO

SOUTENUES LE 30 AVRIL 1970 DEVANT LA COMMISSION COMPOSEE DE :

PRESIDENT	M. CHAPEVILLE
EXAMINATEURS	M. DUBERT
	M. PARAF
INVITE	M. OUDIN

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

à Monsieur le Docteur J. OUDIN

qui m'a accueilli dans son service, a inspiré ce sujet, m'a guidé de ses conseils si souvent prodigués pour l'accomplissement de cette tâche, et a oeuvré constamment pour que mes conditions de travail soient favorables.

Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude et de mon respectueux attachement.

à Monsieur le Docteur J. FOURNIER

qui a facilité mon entrée dans le service du Docteur J. OUDIN.

En témoignage de mon profond respect et de ma reconnaissance pour sa bienveillance.

à Monsieur CHAPEVILLE, Monsieur DUBERT
et Monsieur PARAF

qui m'ont fait l'honneur de participer à ce jury.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mon profond respect.

à Monsieur G. BORDENAVE et Madame C. BREZIN

dont toute l'aide et la constante collaboration à la rédaction de ce texte ont été si précieuses, ainsi qu'à toutes les autres personnes du service du Docteur J. OUDIN, sans le concours et la serviabilité desquels je n'aurais pu mener à bien la réalisation de ce travail.

Qu'ils soient remerciés pour leur amitié.

Je dédie également ce travail

à Monsieur le Professeur Emérite Tiuzi SINDO
Institut des Recherches Médicales,
Université de Tokio

à Monsieur le Professeur Kanafu TABEI
Faculté de Médecine
Université de Kioto

à Monsieur le Professeur Adjoint Shigéaki KAGEYAMA
Faculté de Médecine
Université de Mié

qui ont contribué à ma formation d'Immunologiste et d'Allergologiste et ont favorisé la poursuite de mes études dans le service du Docteur J. OUDIN.

Je me permets de présenter l'expression de ma déférence et de ma reconnaissance profonde.

Ce travail a été effectué grâce aux aides matérielles accordées par le Gouvernement Français, le Centre National de la Recherche Scientifique, the International Cell Research Organization et the European Molecular Biology Organization, que je remercie ici.

TABLE DES MATIERES

Page

INTRODUCTION 1

I) Généralités 1

II) Structure des immunoglobulines 1

a) Structure des IgG 1

b) Structure des IgM 2

III) Les spécificités antigéniques des immunoglobulines 3

a) Généralités 3

b) L'allotypie des immunoglobulines de lapin 3

IV) Délimitation du sujet 5

MATERIEL ET METHODES 8

I) Techniques immunologiques 8

a) Immunisations et immunsérums 8

– Sérums de lapins infectés par *Trypanosoma equiperdum* 8

– Sérums anti hématies de mouton 8

– Sérums anti allotypiques 9

– Immunsérums divers 9

b) Réaction de précipitation antigène anticorps 10

c) Inhibition de la réaction antigène anticorps 10

– Inhibition de la précipitation dans le système allotype sérum anti allotype 10

– Inhibition de l'agglutination dans le système allotype sérum anti allotype 11

– Inhibition de la précipitation au cours de l'analyse immunoélectrophorétique dans le système allotype sérum anti allotype 11

II) Techniques physicochimiques 11

a) Chromatographie d'exclusion et chromatographie sur échangeurs d'ions 11

– Séparation de la fraction de protéines sériques renfermant les IgG de celle contenant les IgM 12
– Préparation de la fraction de protéines sériques renfermant des immunoglobulines de faible poids moléculaire 12
– Purification des IgG 12
– Séparation des fragments de digestion enzymatique des IgG 13
b) Electrophorèse préparative sur la colonne 13
– Préparation des IgM 13
– Essai de purification des microimmunoglobulines 13
c) Précipitation du sérum par le polyéthylène glycol 14
d) Dosage des protéines 14
III) Techniques chimiques 15
a) Réduction des IgM 15
b) Digestion enzymatique des IgG et des IgM 15
– Digestion des IgG par la papaïne 15
– Digestion des IgG par la trypsine 16
– Digestion des IgMs par la papaïne 16
– Digestion des IgM par la trypsine 16

RESULTATS 17
I) Expérience préliminaire 17
II) La répartition des spécificités allotypiques propres aux IgM dans un échantillon de population 22
a) Recherche, dans des sérums de lapins trypanosomés, des spécificités allotypiques propres aux IgM 22
b) Recherche, dans des sérums de lapins normaux, des spécificités allotypiques propres aux IgM 26
III) Les "familles" des spécificités allotypiques chez les IgM et les IgG . . . 29
a) Existence de deux variantes de la spécificité allotypique Aa3 dans les IgM ainsi que dans les IgG 29
b) Localisation sur les fragments de digestion enzymatique des IgG des déterminants qui constituent les deux variantes de la spécificité Aa3 32

IV) Les différences de spécificité entre les motifs allotypiques de la série a portés par les IgG et par les IgM; l'existence, au sein de ces motifs allotypiques, de déterminants antigéniques propres à l'une ou à l'autre des deux classes d'immunoglobulines. 34
V) La comparaison du pouvoir inhibiteur des sous-unités d'IgM et des fragments de digestion d'IgG et d'IgM dans la précipitation des molécules intactes par les sérums anti allotypiques 42
a) L'inhibition de la précipitation du système Aa1 anti Aa1 48
b) Sur la non-précipitabilité des sous-unités et des fragments d'IgG et d'IgM avec les sérums anti allotypiques 52
VI) Les spécificités isotypiques et allotypiques des microimmunoglobulines . . 54
a) Les spécificités isotypiques des microimmunoglobulines 57
– La spécificité isotypique des IgG portée par les microimmunoglobulines 59
– La spécificité isotypique des IgM portée par les microimmunoglobulines 62
– Analyses immunoélectrophorétiques 63
b) Les spécificités allotypiques des microimmunoglobulines 63
– Mise en évidence 63
– Réaction en milieu gélifié des microimmunoglobulines avec les sérums anti allotypiques de la série a 66
– Sur la non-précipitabilité des microimmunoglobulines avec les sérums anti allotypiques de la série a 68
– Les motifs allotypiques Ab4 dans la fraction de microimmunoglobulines 69

DISCUSSION 71
I) Généralités 71
II) Sur les spécificités allotypiques propres aux IgM et différentes des spécificités de la série a 71
III) Sur les différences légères entre les spécificités allotypiques de la série

a selon qu'elles sont portées par les IgM ou les IgG 74
IV) Sur les différences et les parentés entre certains des déterminants allotypiques du motif Aa1 portés par les IgG et les IgM 76
V) Sur la nature des déterminants allotypique Aa1 propres aux IgG et propres aux IgM 78
VI) Sur la non-précipitabilité des sous-unités IgMs et des fragments Fab-μ avec les sérums anti allotypiques 81
VII) Sur les deux variantes de la spécificité allotypique Aa3 chez les IgG et chez les IgM 82
VIII) Sur les microimmunoglobulines 83

RESUME 86

BIBLIOGRAPHIE 89

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableaux

Tableau 1 27
Tableau 2 41
Tableau 3 49
Tableau 4 51
Tableau 5 59

Figures

Figure 1 33
Figure 2 43
Figure 3 44
Figure 4 45
Figure 5 50
Figure 6 53
Figure 7 55
Figure 8 56
Figure 9 57
Figure 10 58
Figure 11 67

Planches

Planche 1 19
Planche 2 25
Planche 3 31
Planche 4 39
Planche 5 47
Planche 6 61
Planche 7 65

INTRODUCTION

I) Généralités

Les immunoglobulines comprennent non seulement des protéines possédant des propriétés anticorps mais aussi des protéines normales et pathologiques qui ont des caractères chimiques et immunochimiques en commun avec des anticorps (Bull. World Health Organ. 1964). Ce ne sont pas des protéines homogènes et elles sont composées de plusieurs espèces de protéines qui diffèrent l'une de l'autre par des caractères immunochimiques et physicochimiques (PORTER 1960). C'est grâce aux développements de techniques d'analyse immunochimique, chimique et physicochimique que l'on a pu éclaircir leurs rapports structuraux. D'autre part, les maladies néoplasiques des cellules productrices d'immunoglobulines, myélomes et macroglobulinémies de Waldenström, ont contribué puissamment à l'élucidation de leurs structures. On peut les classer en cinq par leurs différences antigéniques: IgG, IgM, IgA, IgD et IgE (LENNOX et coll. 1967; EDELMAN et coll. 1969). Toutes les immunoglobulines sont composées par l'assemblage d'une sorte de chaîne polypeptidique de poids moléculaire 22.000-23.000 (dite "chaîne légère"; les diverses catégories de chaînes légères sont communes à toutes les immunoglobulines) et d'une autre sorte de chaîne polypeptidique de poids moléculaire 50.000 à 75.000 (dite "chaîne lourde" et particulière à chaque classe).

II) Struture des immunoglobulines

Parmi ces immunoglobulines, c'est la structure des IgG qui sont plus faciles à préparer et à purifier qui a été la plus étudiée. Mais il est devenu clair successivement que les autres classes d'immunoglobulines aussi ont une structure semblable à celle des IgG: un monomère composé d'une chaîne lourde et une chaîne légère (LH) est polymérisé à degrés variables pour qu'il en résulte un polymère $(LH)_{2n}$.

a) Structure des IgG

La molécule d'IgG a un poids moléculaire 160.000; elle est formée de deux chaînes lourdes de type γ et de deux chaînes légères (de type κ ou de type λ), qui sont reliées entre elles par des ponts disulfures et aussi par des

liaisons non-covalentes (EDELMAN et coll. 1964; FOUGEREAU et coll. 1965). Elles peuvent être séparées par réduction de leurs ponts disulfures, suivie de la filtration sur gel de Séphadex équilibré avec: soit de l'acide propionique 1N, soit de l'acide acétique 1N (FLEISCHMAN et coll. 1962), soit de la guanidine HCl 5N (SMALL et coll. 1966). D'autre part, les IgG peuvent être décomposées par digestion enzymatique par la papaïne en trois fragments de poids moléculaires à peu près équivalents: 2Fab et 1Fc (PORTER 1958 et 1959). Le fragment Fab est composé d'une chaîne légère et d'une partie de la chaîne lourde appelée Fd et il conserve un site anticorps (PORTER 1959; NISONOFF et coll. 1959; FLEISCHMAN et coll. 1963). Le fragment Fc se compose d'une partie des deux chaînes lourdes, dissociable par réduction en deux morceaux semblables, qui sont donc vraisemblablement reliés par leurs ponts disulfures (MARLER et coll. 1964). Il ne possède pas de site anticorps mais possède certaines propriétés biologiques de la molécule native comme celles dont dépendent la fixation du complément et le pouvoir de se fixer aux tissus, de traverser la barrière placentaire (BRAMBELL et coll. 1960, AMIRAIAN et coll. 1961; TARANTA et coll. 1961; OVARY et coll. 1961).

Selon les analyses de la séquence d'acides aminés, chacune des chaînes lourdes et de chaines légères comporte une région constante et une région variable (EDELMAN 1969). Ces deux régions sont, dans les chaînes légères, de même longueur et comprennent environ 108 acides aminés. Dans les chaînes lourdes, la région constante qui, d'après sa structure, se divise en trois parties homologues de même longueur, est trois fois plus longue que la région variable, qui est à peu près de même longueur que celle de la chaîne légère. La région variable qui fournirait la diversité des anticorps et contiendrait le site actif comporte l'extrémité N-terminale d'une chaîne, tandis que la région constante comporte l'extrémité C-terminale.

b) Struture des IgM

La molécule d'IgM a un poids moléculaire d'environ 900.000 et est probablement formée de cinq sous-unités de poids moléculaire 180.000 qui sont reliées entre elles par des ponts disulfures et peuvent être dissociées par une réduction douce suivie d'alkylation (DEUTSCH et coll. 1957; MILLER et coll. 1965; LAMM et coll. 1966). La structure de la sous-unité est considérée

comme semblable à celle de la molécule d'IgG: elle est constituée par deux chaînes lourdes de type μ et de deux chaînes légères, quoiqu'il y ait des expériences indiquant qu'elle puisse être constituée par deux chaînes lourdes et trois chaînes légères (SUZUKI et coll. 1967; SUZUKI 1969). D'après cette structure, on s'attendrait à trouver deux sites anticorps sur une sous-unité et dix sur une molécule d'IgM. Mais les résultats d'expériences sont discordants: quelques auteurs ont confirmé cette prévision, (MERLER et coll. 1968; ONOUE et coll. 1968), par contre d'autres n'ont trouvé qu'un site anticorps sur une sous-unité et cinq sur une molécule native (ONOUE et coll. 1965; SCHROHENLOHER et coll. 1968). Ce problème de la valence des IgM reste à éclaircir; il le sera peut-être lorsqu'on aura une meilleure connaissance de l'arrangement des chaînes dans les IgM.

III) Les spécificités antigéniques des immunoglobulines

a) généralités

La classification des immunoglobulines est faite sur la base des différences structurales révélées par l'analyse immunochimique sous forme de différences de spécificité antigénique. On distingue aujourd'hui trois sortes de spécificités antigéniques: La spécificité isotypique, la spécificité allotypique et la spécificité idiotypique (OUDIN 1968). La spécificité isotypique est uniforme pour chaque protéine chez tous les individus de la même espèce animale (OUDIN 1960 I et III). C'est par cette spécificité que l'on distingue les classes d'immunoglobulines: IgG, IgM, IgA etc ... La spécificité allotypique est celle qui n'est pas la même chez tous les individus de l'espèce pour une protéine caractérisée par sa spécificité isotypique et est transmise héréditairement (OUDIN 1956, I et II, 1960 I, II, et III). La spécificité idiotypique est celle qui est différente, chez un individu donné, sur des molécules douées de la fonction anticorps contre des antigènes différents: elle est différente aussi, chez des individus différents, sur des anticorps contre le même antigène (OUDIN et coll. 1963, 1969 I et II).

b) L'allotypie des immunoglobulines de lapin.

Parmi les différentes classes d'immunoglobulines de lapin, ce sont les IgG qui sont les plus abondantes, les mieux connues, et qui ont été les plus étudiées. Les sept principales spécificités allotypiques des IgG sont Aa1, Aa2, Aa3, Ab4, Ab5, Ab6 et Ab9 et les sept gènes qui les régissent se distribuent

en deux séries de trois et quatre allèles respectivement (OUDIN 1960 I, II et III; DRAY et coll. 1962; DUBISKI et coll. 1967); les trois premières sont régies par les allèles d'un locus a et sont localisées sur le fragment Fd de la chaîne lourde, et les 4 dernières sont régies par les allèles d'un autre locus b et sont localisées sur la chaîne légère (OUDIN 1963; KELUS 1963; STEMKE 1964; WILHEIM et coll. 1966). Il n'y a pas de liaison étroite entre les locus a et b. Plusieurs expériences entreprises pour chercher la nature chimique des motifs allotypiques montrent 1° qu'ils semblent résider dans les structures primaires, 2° que les différences d'un allotype à l'autre comprennent 11 à 15 résidus par chaîne, au lieu d'être limitées à un ou deux acides aminés comme dans les cas des facteurs Gm et Inv de IgG humaines, et 3° que les résidus responsables des déterminants allotypiques de la série a sont principalement localisés dans 40 acides aminés de l'extrémité N-terminale, c'est-à-dire dans la région variable (INMAN 1967; KOSHLAND 1967; KOSHLAND et coll. 1968; PRAHL et coll. 1968; WILKINSON 1969).

Puisqu'il est généralement admis que les chaînes légères sont communes à toutes les classes d'immunoglobulines et qu'il est connu que les spécificités allotypiques de la série b sont sur les chaînes légères, on pouvait s'attendre à les trouver sur toutes les classes d'immunoglobulines et c'est ce qui a été observé. Il est aussi généralement admis que les classes d'immunoglobulines diffèrent par leurs chaînes lourdes. Mais depuis que, dans ce laboratoire, les spécificités allotypiques de la série a ont été trouvées sur les IgM (TODD 1963) et que cette observation a été complétée par leur mise en évidence sur les IgA (FEINSTEIN 1963), ce fait paradoxal, que la même spécificité allotypique se trouve sur les immunoglobulines de différentes classes d'un individu, a suscité de nombreuses discussions sur la synthèse et l'évolution des immunoglobulines (OUDIN 1966 I et II; LENNOX et coll. 1967; EDELMAN et coll. 1969). Mais pour discuter les hypothèses qui ont été emises en tenant compte de ce fait, il faudrait encore plus d'expériences concernant la nature comparée des motifs allotypiques des chaînes lourdes. A ce point de vue, s'il se trouve bien quelques différences entre les déterminants allotypiques de la série a des chaînes lourdes γ et μ (TODD et coll. 1967) de nouveaux éléments s'ajouteraient en faveur de certaines hypothèses.

IV) Délimitation du sujet

Parallèlement à la progression dans la connaissance de la structure et du contrôle génétique de la synthèse des IgG, des études ont été réalisées concernant les mêmes problèmes pour les IgM. Une condition indispensable pour travailler sur les IgM est, pourtant, l'obtention d'une quantité suffisante de celles-ci. Chez l'homme, les macroglobulinémies de Waldenström ont fourni abondamment le matériel et ce sont les IgM pathologiques qui ont facilité les études. Par contre, chez le lapin pour lequel les macroglobulinémies de cause semblable ne sont pas connues, les études sur les IgM étaient difficilement accessibles: la faible quantité d'IgM dans le sérum normal est un facteur limitant. A cet égard, la trypanosomiase nous a permis d'améliorer les conditions expérimentales: il est connu en effet que chez le lapin infecté par les trypanosomes la concentration d'IgM dans le sérum augmente notablement (PAUTRIZEL et coll. 1959, MATTERN et coll. 1963). Il n'est pas connu si cette augmentation d'IgM peut être totalement attribuée à la production des anticorps anti trypanosomes ou si elle ne représente qu'une des conséquences non-spécifiques de l'agression intense subie par le sujet, qui se traduisent par des modifications quantitatives des protéines sériques, ce qui est d'ailleurs accessoire dans notre étude.

Nous avons, dans une première expérience, soumis un mélange de sérums de lapins infectés par *Trypanosoma equiperdum* et les fractions de ce mélange de sérums à l'analyse immunochimique au moyen de leurs réactions avec des sérums anti allotypiques. Nous nous sommes efforcé de classer les différences de spécificité allotypique observées lors de cette analyse en distinguant: d'une part les spécificités allotypiques propres à une classe d'immunoglobulines (en fait les IgM) et, d'autre part, les différences qui sont apparemment attribuables à des déterminants antigéniques faisant partie d'un motif allotypique de la série a et portés pourtant par une seule des deux classes. Après avoir soumis à des épuisements appropriés les immunsérums précipitants qui avaient permis de déceler ces différences, nous avons cherché à déceler dans les sérums d'un certain nombre de lapins les structures qui sont responsables de ces différences, en vue de savoir dans quelle mesure la mise en évidence de ces structures

semblait être liée à l'existence, dans les mêmes sérums, d'un motif allotypique donné de la série a.

Les signes de l'existence des structures responsables des différences décelées ont été cherchées non seulement dans des sérums, dans les fractions de sérum qui contiennent les IgM et les IgG, et dans des préparations purifiées de ces deux protéines, mais encore dans des préparations de leurs fragments obtenus par digestion et dans des sous-unités d'IgM préparées par réduction. Une grande partie de ces préparations n'étant pas précipitables par les sérums anti allotypiques qui précipitaient pourtant les protéines intactes, nous nous sommes servi, pour les étudier, de leur pouvoir inhibiteur à l'égard de la précipitation de ces protéines.

Les spécificités allotypiques ont enfin été cherchées, concurramment avec les spécificités isotypiques des IgM et des IgG sur des protéines de poids moléculaire relativement faible ("microimmunoglobulines") mises en évidence dans des sérums de lapins infectés par le trypanosome et de lapins normaux.

Dans cet exposé les abréviations suivantes sont utilisées pour désigner les immunoglobulines et leurs fragments

IgG : 7S globuline γ

IgM : 19S macroglobuline γ_1 ou β_2

IgMs : sous-unité obtenue par réduction douce et alkylation d'IgM

Fc : fragment Fc obtenu par digestion enzymatique d'IgG par la papaïne

Fab-γ-pap: fragment Fab obtenu par digestion enzymatique d'IgG par la papaïne

Fab-γ-try: fragment Fab obtenu par digestion trypsique d'IgG

Fab-μ-pap: fragment Fab obtenu par digestion enzymatique d'IgM par la papaïne

Fab-μ-try: fragment Fab obtenu par digestion trypsique d'IgM

Hμ : chaîne lourde de type μ

L : chaîne légère

En outre, les abréviations suivantes sont aussi utilisées:

MSTr : mélange de sérums de 5 lapins trypanosomés, offert par le Docteur PILLOT

Fr micro : fraction contenent les microimmunoglobulines, obtenue par chromatographie d'exclusion sur gel de dextrane

Ep micro : fraction contenant les microimmunoglobulines, obtenue par électrophorèse préparative de Fr micro.

MATERIEL ET METHODES

I) Techniques immunologiques

a) Immunisations et immunsérums

– Sérums de lapins infectés par *Trypanosoma equiperdum*

Un mélange de sérums provenant de cinq lapins infectés par *Trypanosoma equiperdum* a été offert par le Docteur PILLOT que nous remercions très vivement pour nous avoir aimablement fourni ce matériel. On le désignera par l'abréviation: MSTr. Le phénotype de chacun des lapins n'étant pas connu seul celui du mélange: Aa1, Aa2, Aa3 et Ab4 a pu être établi.

On a d'autre part, immunisé 9 lapins de race Bouscat contre *Trypanosoma equiperdum* en leur injectant par voie intrapéritonéale 1ml d'une suspension $1x10^6$ germes sous 1ml. Les animaux ont été saignés à blanc 15 jours après cette injection, c'est-à-dire au moment où le taux d'IgM semble le plus fort et les immunsérums ont été recueillis individuellement. Pour ce qui est de l'allotypie de leurs immunoglobulines, 3 de ces lapins avaient le phénotype Aa1b4, 2: Aa2b4, 3: Aa3b4 et le dernier Aa1a2b4.

Pour étudier la fluctuation des IgM sériques, 4 lapins de races variées (phénotype Aa3b4) ont reçu par voie intrapéritonéale des doses différentes de *Trypanosoma equiperdum* (deux lapins ont reçu chacun une injection de $1x10^5$ germes sous 1ml et deux autres une injection de $1x10^7$ germes sous 1ml). Ces lapins ont été saignés à l'oreille tous les 5 jours durant 1 mois, la première saignée intervenant 5 jours après l'injection. Il a ainsi été déterminé que le taux d'IgM atteignait un maximum au bout du 15ème jour après l'inoculation de *Trypanosoma equiperdum* et diminuait lentement ensuite.

Nous remercions très vivement le Docteur DUPOUEY qui nous a fourni des suspensions de culture de *Trypanosoma equiperdum* et qui a inoculé les lapins.

– Sérums anti hématies de mouton

Nous avons immunisé un lapin de phénotype Aa3b4 (race Bouscat) et 2 lapins de phénotype Aa1a2b4 (races Bouscat et Bourgogne) en injectant par voie intraveineuse une suspension d'hématies de mouton à 10% préalablement lavées 3 fois avec de l'eau salée à 0,9%. Le premier

lapin a reçu à une semaine d'intervalle 4 injections de 5ml chacune de la suspension précédemment décrite et a été saigné à blanc une semaine après la dernière injection; les deux autres lapins ont reçu à 3 jours d'intervalle et toujours par la même voie 6 injections de 5ml de la même suspension et ils ont été saignés à l'oreille une semaine après la dernière injection.

– Sérums anti allotypiques

Des sérums anti allotypiques préparés par injections de précipité spécifique additionné d'adjuvant complet de Freund ont été fournis par le Docteur OUDIN que nous remercions bien vivement. (On appellera ces sérums anti allotypiques sérum anti précipité spécifique $Aa1^+$, $Aa2^+$, $Aa3^+$ ou $Ab4^+$ selon le cas).

Nous avons préparé un sérum anti allotypique Aa1 en injectant à un lapin de race Flandre des IgM purifiées additionnées d'adjuvant complet de Freund. Au cours de la 1ère injection l'animal a reçu dans le coussinet plantaire de ses 4 pattes une quantité totale d'IgM de 4mg sous un volume d'émulsion de 0,8ml (0,2ml d'émulsion dans chaque patte). Deux autres injections ont été pratiquées par voie intramusculaire sur la face externe des pattes arrières respectivement 11 semaines et 23 semaines après la 1ère injection. Nous avons de nouveau injecté chaque fois 4mg d'IgM purifiées sous 0,8ml d'émulsion. Ce lapin a été saigné à l'oreille 2 semaines et 4 semaines après la 2ème injection et 2 semaines après la 3ème injection. Les sérums recueillis seront appelés sérums anti IgM $Aa1^+$.

– Immunsérums divers

Nous avons encore utilisé un sérum de brebis anti sérum de lapin, 3 sérums de chèvres respectivement anti IgG de lapin, anti IgG humaines, anti Fab-γ-pap d'IgG de lapin, un sérum de mouton anti IgG de lapin et un sérum de poule anti IgM de lapin. Ces immunsérums qui nous ont été fournis par le Docteur OUDIN ont été préparés par injections de matériel immunisant additionné des adjuvants complets de Freund. Les deux derniers immunsérums (le sérum de mouton anti IgG de lapin et le sérum de poule anti IgM de lapin) ont été utilisés soit bruts, soit épuisés par les IgM ou les IgG ce qui a permis d'obtenir des sérums anti chaîne γ et anti chaîne μ respectivement.

Tous les sérums recueillis ont été filtrés sur filtres Seitz et aseptisés

par addition de NaN_3 à la concentration finale 1/2500. Les sérums ont ensuite été conservés à 4°C.

b) Réactions de précipitation antigène anticorps

Elles ont été étudiées en milieu liquide à l'interface entre deux solutions dont l'inférieure est nécessairement la plus dense et dans des tubes de verre de 2mm de diamètre intérieur. La lecture des réactions a été faite à plusieurs reprises durant les 5 heures qui suivent la mise en présence des réactifs.

Elles ont aussi été étudiées en milieu gélifié en tubes et en cuves à faces parallèles selon la méthode mise au point par OUDIN (1946, 1955).

Pour ce qui est de l'analyse immuno-électrophorétique nous avons eu recours à la technique de SCHEIDEGGER (1955).

c) Inhibition de la réaction antigène anticorps

– Inhibition de la précipitation dans le système allotype sérum anti allotype.

Elle a été effectuée selon le principe décrit par KABAT (1954). On a ajouté des quantités connues d'inhibiteurs (sous-unités ou fragments d'immunoglobulines) sous un volume de 0,1ml, à un volume donné de l'immunsérum anti allotypique choisi (0,1ml pour le sérum n°335 anti précipité spécifique $Aa1^+$ et le sérum n°212 anti précipité spécifique $Aa3^+$ et 0,2ml pour le sérum n°003 anti IgM $Aa1^+$). Après 30 minutes à 37°C, une quantité d'antigène (IgG ou IgM) variable suivant le système précipitant et choisie pour que le rapport antigène anticorps soit proche de celui de l'équivalence a été ajoutée à chacun des mélanges précédents. Deux sortes de témoins ont été réalisés, le premier contient l'immunsérum et l'antigène sans inhibiteur, le deuxième ne comprend que l'immunsérum sans antigène ni inhibiteur. Les mélanges sont agités immédiatement, placés à 37°C durant 30 minutes et laissés entre 0° et 4°C durant 3 jours, pendant lesquels ils ont été agités plusieurs fois par jour. Après cela les tubes contenant les mélanges ont été centrifugés dans une centrifugeuse réfrigérée et les culots ont été lavés 3 fois avec de l'eau salée à 0,9% refroidie entre 0° et 4°C. Les précipités ont été dissous dans 3 gouttes de NaOH 1N et analysés selon la technique décrite par LOWRY et coll. (1951) qui fait emploi de réactif de Folin-Ciocalteux. La diminution de l'intensité de la réaction de précipitation pour chaque concentration d'inhibiteur a été traduite en pourcentage d'inhibition.

– Inhibition de l'agglutination dans le système allotype sérum anti allotype.

La technique d'inhibition de l'agglutination utilisée dans nos expériences était la même que celle décrite pour le typage des facteurs Gm du sérum humain (HARBOE 1959). On a ajouté 0,25ml de sérum à étudier dilué au 1/10 dans de l'eau salée à 0,9%, au même volume de l'immunsérum dilué de façon à obtenir une agglutination convenable (par exemple le sérum n°335 anti précipité spécifique $Aa1^+$ a été dilué 1/40 dans de l'eau salée à 0,9%). Après 30 minutes à 37°C, on a ajouté à ce mélange 0,05ml d'hématies de mouton à 2,5%, sensibilisées préalablement par des fragments Fab anti hématies de mouton obtenus après digestion par la papaïne d'IgG purifiées anti hématies de mouton. Ces IgG portaient les motifs allotypiques Aa1, Aa2 et Ab4. Après avoir laissé les mélanges à 37°C durant 2 heures on lit les résultats en observant la forme des culots. Au cours de cette étude tous les sérums et toutes les solutions de protéines sériques étudiées ont été testées pour un éventuel pouvoir agglutinant naturel anti hématies. Dans les rares cas (plus particulièrement pour les solutions d'IgM) où ce pouvoir a été observé on a procédé à l'épuisement des sérums ou des solutions de protéines sériques par des hématies de mouton.

– Inhibition de la précipitation au cours de l'analyse immunoélectrophorétique dans le système allotype sérum anti allotype.

Lorsqu'une réaction antigène anticorps ne se manifeste pas par une précipitation ou ne se manifeste que par une précipitation faible, la localisation de l'antigène au cours de la migration électrophorétique peut être réalisée par la technique de HAMERS et coll. (1965).

Après avoir soumis l'antigène non-précipitant à la migration électrophorétique sur une plaque couverte d'un gel d'agarose à 1% on creuse deux gouttières de part et d'autre de son point d'application. Dans l'une des gouttières on met l'immunsérum correspondant et dans l'autre l'antigène qu'il est en mesure de précipiter fortement. La réaction de cet antigène avec l'immunsérum se traduit par une zone de précipitation parallèle aux gouttières qui est interrompue à l'endroit où a migré l'antigène non précipitant.

II) Techniques physicochimiques

a) Chromatographie d'exclusion et chromatographie sur échangeurs d'ions.

– Séparation de la fraction de protéines sériques renfermant les IgG de celle contenant les IgM.

Après avoir éliminé les β–lipoprotéines du sérum par la méthode de BURSTEIN (1960) qui fait emploi de sulfate de dextrane et de chlorure de calcium. Ce sérum est soumis à une chromatographie d'exclusion sur Séphadex G200 (Pharmacia, Upsala, Suède) équilibré avec du tampon phosphate de pH 7,0 contenant en plus du NaCl à la concentration 0,15M. Cette chromatographie d'exclusion permet de séparer les constituants du sérum en 3 fractions, la première contient en particulier les IgM, la seconde les IgG et elles sont utilisées comme telles.

– Préparation de la fraction de protéines sériques renfermant des immunoglobulines de faible poids moléculaire.

La fraction d'immunoglobulines de faible poids moléculaire (on pourra encore les appeler microimmunoglobulines et l'abréviation Fr micro sera généralement utilisée dans cet exposé) a été obtenue par 2 filtrations successives du sérum sur Séphadex G200 et Séphadex G100. La dernière moitié de la 3ème fraction obtenue par la filtration du sérum sur Séphadex G200 a été recueillie, concentrée et filtrée de nouveau sur Séphadex G100. La dernière moitié de l'unique fraction obtenue au cours de cette filtration sur Séphadex G100 a été recueillie et considérée comme la fraction qui contient les microimmunoglobulines. Cette fraction a été concentrée 15 fois par rapport au volume initial de sérum.

D'autres emplois ont été faits de la chromatographie d'exclusion notamment: pour séparer les sous-unités d'IgM, les fragments de digestion par la papaïne de ces sous-unités, les fragments de digestion par la trypsine des IgM, les chaînes polypeptidiques des IgM, et les fragments de digestion par la trypsine des IgG.

– Purification des IgG

Des IgG ont été préparées par chromatographie sur diéthyl-amino-éthyl-cellulose (D.E.A.E. cellulose, lot Serva) selon la méthode de LEVY et coll. (1960) de la fraction de précipitation du sérum par le sulfate d'ammonium à

50% de saturation. Cette chromatographie a été effectuée à 4°C. La fraction éluée avec de tampon phosphate 0,0175M de pH 6,3 renferme les IgG qui ont été recueillies, concentrées et dont la pureté a été jugé satisfaisante par analyse immunoélectrophorétique.

– Séparation des fragments de digestion enzymatique des IgG.

Les produits de digestion des IgG par la papaïne ont été séparés par chromatographie sur carboxy-méthyl-cellulose (C. M. cellulose, lot Serva) selon la méthode de PORTER (1959).

Les fragments de digestion des IgG par la trypsine ont été purifiés par passage sur colonne de C.M. cellulose dans les mêmes conditions que celles de la séparation des fragments de digestion papaïnique.

b) Electrophorèse préparative sur la colonne

– Préparation des IgM

Les IgM ont été purifiées à partir de la première fraction des filtrations du sérum sur Séphadex G200. Après une dialyse contre un tampon alcalin au glycocolle de pH 8,8 et de force ionique $\mu = 0,1$, cette fraction a été soumise à une électrophorèse sur une colonne (LKB type 3340C) à support solide (Séphadex G10) équilibré avec le même tampon. On applique une différence de potentiel de 310 V (intensité 70 mA) pendant 18 à 22 heures. La courbe de densité optique à 2800 Å de l'élution des produits de cette migration électrophorétique a permis d'observer 2 ou 3 accidents selon le sérum utilisé. La moitié cathodique de la fraction qui a migré le moins a été recueillie, concentrée et il a été déterminé par analyse immunoélectrophorétique qu'elle contenait des IgM dont l'état de pureté a été jugé satisfaisant.

– Essai de purification des microimmunoglobulines

La fraction des protéines considérée comme renfermant les Fr micro et obtenue après deux filtrations successives du sérum du phénotype Aa1a2b4 sur Séphadex G200 et Séphadex G100 a été soumise à une électrophorèse preparative sur colonne dans les mêmes conditions que celles décrites pour la purification des IgM. On a recueilli et concentré les fractions qui ont donné une réaction de précipitation positive en milieu liquide à l'interface avec au moins un des 3 immunsérums suivants: sérum anti IgG de lapin, sérum anti Aa2 et sérum anti Ab4. Dans cet exposé ces fractions seront désignées par

l'abréviation Ep micro.

c) Précipitation du sérum par le polyéthylène glycol.

La précipitation du sérum par le polyéthylène glycole de poids moléculaire 6000 (Touzart et Matignon, Paris) qui permet de concentrer les IgM a été effectuée suivant la méthode de CHESEBRO et coll. (1968). A un volume donné de sérum dont le pH est ajusté aux environs de 8 à l'aide de NaOH 1 N on ajoute un volume égal d'une solution de polyéthylène glycol à 15%. On laisse 4 heures en contact à 4°C et on recueille le précipité que l'on dissous et dialyse abondamment dans de l'eau salée à 0,9%. Les IgM ainsi obtenues sont concentrée approximativement 5 à 10 fois par rapport au volume initial de sérum.

d) Dosage des protéines

Les concentrations des immunoglobulines et de leurs fragments sont évaluées à partir de la densité optique à 280 mμ affectée des facteurs suivants pour des solutions de référence à 1mg/ml:

IgM et IgMs $D.O.^{1cm}_{280m\mu} = 1,34$ (ONOUE et coll. 1965)

IgG $D.O.^{1cm}_{280m\mu} = 1,46$ (ONOUE et coll. 1965)

Fabγ et Fabμ $D.O.^{1cm}_{280m\mu} = 1,50$ (STEMKE 1963; HABER et coll. 1967)

L $D.O.^{1cm}_{280m\mu} = 1,18$ (HABER et coll. 1967)

Hμ $D.O.^{1cm}_{280m\mu} = 1,3$*

Les concentrations molaires d'IgMs, Fabμ et Fabγ sont calculées en considérant les poids moléculaires suivants:

180.000 pour IgMs

50.000 pour Fabμ et Fabγ

---

* Comme nous n'avons pas trouvé de référence pour ce qui est de coefficient d'extinction de chaîne lourde μ, nous leur avons attribué arbitrairement un coefficient qui se rapproche de celui des IgM.

III) Techniques chimiques

a) Réduction des IgM

La réduction et l'alkylation des IgM ont été effectuées suivant la méthode de ONOUE et coll. (1965). Les IgM en solution à 1% dans un tampon Tris hydroxy méthyl amino méthane HCl (tampon Tris HCl) 0,1M de pH 8,0 ont été réduites par addition de 2 mercaptoéthanol (Eastman Organic Chemicals, New York) à la concentration finale 0,1M. La réduction a duré 40 minutes à la température de laboratoire et 6 heures à 4°C. La reaction a été arrêtée par addition à 4°C d'iodoacétamide (British Drug House) à la concentration finale 0,11M. Durant cette alkylation, le pH a été maintenu aux environs de 8 à l'aide de NaOH 5N. Les sous-unités d'IgM (IgMs) ont été séparées des agrégats par filtration des produits réduits et alkylés sur Séphadex G200 équilibré dans le tampon Tris HCl 0,1M de pH 8,0. Pour séparer les chaînes polypeptidiques (chaînes lourdes μ et chaînes légères) constituant les sous-unités IgMs, les IgMs ont été dialysées contre une solution de guanidine HCl 5M et soumises à une chromatographie d'exclusion sur Séphadex G200 équilibré avec la guanidine HCl 5M (LAMM et coll. 1966).

b) Digestion enzymatique des IgG et des IgM

– Digestion des IgG par la papaïne

Elle a été conduite suivant les modalités techniques établies par PORTER (1959). A une solution d'IgG à 1% dans un tampon acétate 0,1M de pH 5,6, on ajoute de la papaïne (2 fois recristallisée, Nutritional Biochemical Corporation) en solution de l'eau distillée de façon que le rapport papaïne/protéine soit égal à 1/100. Le mélange contenait en outre de la cystéine à la concentration finale 0,01M et de l'éthylène diamine tetra acétique (E.D.T.A.) à la concentration finale 0,002M. La réaction a duré 4 heures à 37°C. La solution des produits digérés est ensuite vigoureusement dialysée à 4°C contre un tampon acétate 0,01M de pH 5,4. Après élimination du précipité qui s'est produit pendant la dialyse, les produits digérés ont été séparés par chromatographie sur CM cellulose, équilibrée avec le tampon acétate 0,01M de pH 5,4. Après élution du premier fragment qui n'est pas adsorbé sur la colonne, les autres produits de la digestion sont élués à l'aide d'un gradient de concentrations qui conduit du premier tampon acétate 0,01M de pH 5,4 à un autre

tampon acétate 0,9M de pH 5,4.

– Digestion des IgG par la trypsine

La digestion des IgG par la trypsine (EDELMAN et coll. 1968; WALLER et coll. 1969) a été effectuée sur les IgG réduites et alkylées (les conditions de réduction et alkylation des IgG ont été les mêmes que celles utilisées pour les IgM) en solution à 1% dans un tampon Tris HCl 0,1M de pH 8,0. Le rapport trypsine/protéine était égal à 1/25. On a utilisé de la trypsine 2 fois recristallisée (Nutritional Biochemical Corporation). La réaction a duré 6 heures à 37°; elle est arrêtée par addition d'un inhibiteur de la trypsine extrait de soja (Nutritional Biochemical Corporation).

Les produits digérés ont été séparés par chromatographie d'exclusion sur Séphadex G200 équilibré avec du tampon Tris HCl 0,1M de pH 8,0 et préalablement étalonnée avec le fragment Fab-γ-pap. On a recueilli la fraction dont le volume d'élution correspondait à celui du fragment Fab-γ-pap. Les fragments Fab-γ-try ont été purifiés à partir de cette fraction par chromatographie sur CM cellulose dans les mêmes conditions que celles décrites pour la séparation des fragments de digestion papaïnique des IgG.

– Digestion des IgMs par la papaïne

Les IgMs en solution à 0,5% dans un tampon phosphate de pH 7,0 contenant en plus du NaCl à la concentration 0,15M ont été digérées par la papaïne dans les mêmes conditions que celles décrites pour les IgG, à l'exception du tampon utilisé (ONOUE et coll. 1967). Les produits digérés ont été séparés par chromatographie d'exclusion sur Séphadex G200 équilibré avec un tampon Tris HCl 0,1M de pH 8,0.

– Digestion des IgM par la trypsine

Elle a été conduite suivant la méthode de MILLER et coll. (1966). Les IgM en solution à 1% dans un tampon Tris HCl 0,1M de pH 8,0 ont été digérées par la trypsine durant 18 heures à 37°C en présence de $CaCl_2$ à la concentration 0,01M. Le rapport trypsine/protéine était égal à 1/100. La réaction a été arrêtée par addition d'une quantité équivalente à celle de la trypsine d'un inhibiteur extrait de soja. Les produits digérés ont été séparés par chromatographie d'exclusion sur Séphadex G200 équilibré avec le tampon Tris HCl 0,1M de pH 8,0.

RESULTATS

I) Expérience préliminaire

Cette expérience préliminaire portait sur un mélange de sérums de lapins infectés par *Trypanosoma equiperdum,* qui avait été aimablement mis à notre disposition par le Docteur PILLOT. Les réactions avec des immunsérums contre des motifs allotypiques des séries a et b ont permis d'y déceler les motifs allotypiques Aa1, Aa2, Aa3 et Ab4.

Ce mélange de sérum (MSTr) a été fractionné par chromatographie d'exclusion sur Séphadex G200. Les quatre photographies A, B, C et D de la planche 1 sont celles des réactions du mélange MSTr et de deux de ses fractions avec quatre sérums anti allotypiques (anti Ab4, anti Aa1, anti Aa2 et anti Aa3). Ces sérums avaient été obtenus en injectant à des lapins des précipités spécifiques avec de l'adjuvant complet de Freund. Nous supposerons que les antigènes de la fraction de macroglobulines (ler pic) et de la fraction de 2ème pic de chromatographie d'exclusion sur Séphadex G200 qui sont précipités par les sérums anti allotypiques sont respectivement des IgM et des IgG.

Sur les photographies de la planche 1 et sur le schéma qui lui est annexé, on peut faire les observations suivantes. La réaction du sérum anti Ab4 (cuve A) se manifeste par deux zones de précipitation très rapprochées. Ces deux zones traduisent l'existence de deux sous-classes d'immunoglobulines différantes l'une de l'autre par les motifs allotypiques Ab4′ et Ab4″ (différents mais régis par des gènes étroitement liés) que portent leurs chaînes polypeptidiques légères. Ces deux zones sont continues en regard des trois couches de solution d'antigène; la réaction n'indique par conséquent aucune différence de spécificité antigénique entre les motifs Ab4′ et Ab4″ qui sont portés par les macroglobulines et ceux qui sont portés par les autres immunoglobulines du sérum.

Au contraire, des différences sont décelables dans les réactions des trois sérums contre les motifs de la série a.

Dans la réaction du sérum n°335 anti Aa1 (cuve B) ces différences sont de deux sortes: la zone de précipitation unique en face des deux couches

Planche 1

A. B. C. et D. Comparaison des spécificités allotypiques portés par les IgG et les IgM

Réactions en milieu gélifié (diffusion double) dans quatre cuves à faces parallèles, de quatre sérums anti allotypiques avec un mélange (MSTr) de sérums de lapins infectés par *Trypanosoma equiperdum* et deux de ses fractions.

Dans chaque cuve, la couche inférieure contient un sérum anti allotypique; au-dessus de cette couche a été placée une couche de gélose pure (elle est délimitée par deux traits blancs horizontaux); au-dessus de celle-ci trois couches gélosées (délimitées par des traits blancs verticaux) contiennent, de gauche à droite:

– 1° la fraction de macroglobulines (1er pic du fractionnement sur Séphadex G200 du mélange de sérums: MSTr-1 sur le schéma)

– 2° le mélange MSTr lui-même;

– 3° la fraction de chromatographie d'exclusion sur Séphadex G200 du mélange de sérums qui contient les IgG (2ème pic: MSTr-2 sur le schéma).

Les sérums anti allotypiques placés à la couche inférieure sont:

- dans la cuve A, le sérum n°034 anti Ab4;
- dans la cuve B, le sérum n°335 anti Aa1;
- dans la cuve C, le sérum n°216 anti Aa2;
- dans la cuve D, le sérum n°212 anti Aa3.

Les concentrations des solutions d'antigènes dans les couches supérieures ont été choisies de manière que la zone principale de précipitation ait sensiblement la même position dans les trois réactions de chaque cuve; le rapport des concentrations de l'antigène des 2èmes et 3èmes couches supérieures (mélange MSTr et fraction qui contient les IgG) avec les anticorps est voisin du rapport d'équivalence. Au contraire la concentration d'antigène dans la fraction de macroglobulines de la première couche supérieure est en excès par rapport aux anticorps des immunsérums anti Aa1, Aa2 et Aa3. Un volume de cette fraction contient les macroglobulines d'environ 20 volumes de MSTr.

E. Comparaison des spécificités allotypiques propres aux IgM et différentes des spécificités de la série a.

Réaction en milieu gélifié (diffusion double en cuve à faces parallèles) de la fraction de macroglobulines du sérum MSTr (le 1er pic de Séphadex G200) avec les sérums anti allotypiques épuisés par la fraction contenant les IgG du même sérum MSTr.

couche supérieure: la fraction de macroglobulines de sérum MSTr (MSTr-1)

couche intermédiaire: la gélose pure

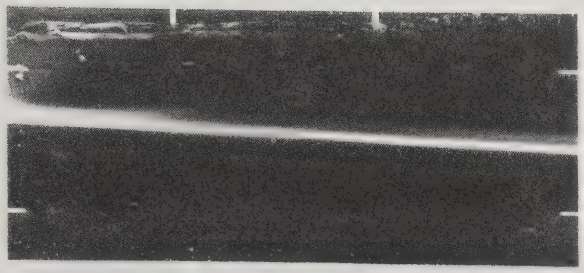
couches inférieures: de gauche à droite

le sérum n°212 anti Aa3 épuisé par MSTr-2

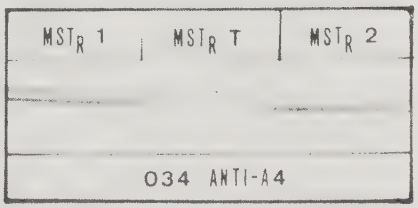
le sérum n°335 anti Aa1 épuisé par MSTr-2

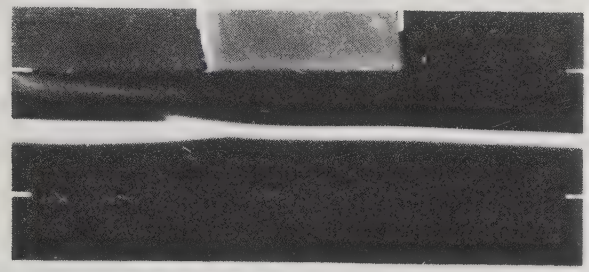
le sérum n°216 anti Aa2 épuisé par MSTr-2

Planche 1

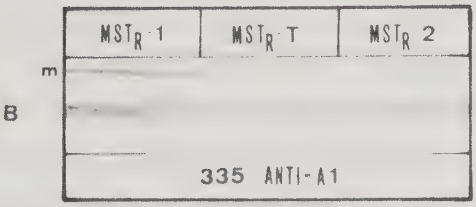


A

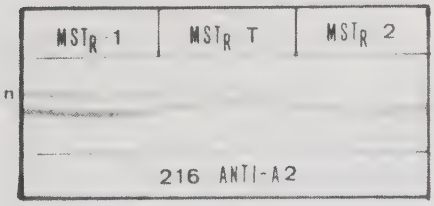




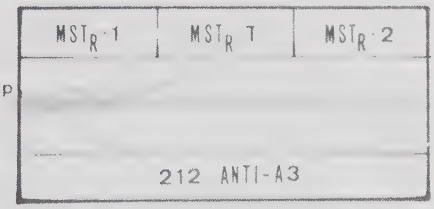
B

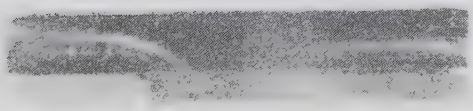


C

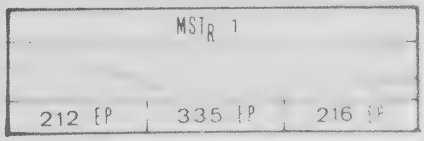


D





E



de droite est bifurquée, en regard de l'interface qui sépare la couche de macroglobulines de la couche de sérum total. La branche supérieure de cette bifurcation, qui se termine rapidement, fait partie de l'image classique des réactions croisées; elle indique qu'une partie des anticorps de l'immunsérum, qui est précipitée par le mélange MSTr et sa fraction contenant les IgG, n'est pas précipitée par la fraction des macroglobulines. Les choses se passent donc comme si le motif Aa1 porté par les IgM manquait de certains déterminants antigéniques portés par les IgG.

Une autre différence encore plus tranchée consiste dans la présence d'une zone de précipitation, désignée par m sur le schéma, visible seulement en face de la couche de macroglobulines. Cette zone de précipitation, qui est distincte de la précédente, est due par conséquent à un antigène présent dans la fraction de macroglobulines et différent de celui qui porte le motif Aa1. Les choses se passent donc comme si le sérum n°335 anti Aa1 précipitait, dans la fraction de macroglobulines, un allotype distinct de celui qui porte le motif Aa1 dans les IgG et qui porte le même motif avec une petite différence, dans les IgM.

La réaction du sérum n°216 anti Aa2 (cuve C) est un peu plus simple, car la première zone de précipitation (la plus éloignée de la source d'antigène) apparaît comme tout à fait continue en face des trois couches de solution d'antigène, comme si tous les anticorps qui participent à cette zone de précipitation étaient précipités indifféremment par l'antigène correspondant contenu dans l'une quelconque des trois solutions d'antigène. Une autre zone, désignée par n sur le schéma, tout à fait distincte de la précédente, s'observe exclusivement en face de la couche de macroglobulines. Le même commentaire pourrait être fait à son sujet qu'au sujet de la zone m d'aspect semblable observée dans la cuve précédente.

La réaction du sérùm n°212 anti Aa3 (cuve D) est d'un aspect différent. La zone principale de précipitation est continue, sauf en regard de l'interface qui sépare la couche de macroglobulines de la couche de sérum MSTr. En regard de cet interface, la zone principale de précipitation est bifurquée d'une manière semblable à ce qui a été observé dans la cuve B, ce qui s'explique de la même manière. En outre, une autre branche de bi-

furcation, qui se termine elle aussi rapidement, est tournée au contraire vers la couche de sérum MSTr. Les choses semblent donc se passer comme si le motif Aa3 porté par les IgG manquait de certains déterminants antigéniques qui existent sur les IgM. Il peut être utile de remarquer qu'il suffirait que la concentration de l'antigène des macroglobulines qui porte ces déterminants soit, par rapport à la concentration de l'antigène correspondant des IgG et à la concentration des anticorps contre les déterminants propres aux macroglobulines, sensiblement plus faible pour que la réaction de ces anticorps se manifeste par une zone de précipitation distincte semblable aux zones m et n des cuves B et C. De même, il suffirait que, dans les réactions des sérums anti Aa1 et anti Aa3 (cuves B et D), la concentration des antigènes des IgG porteurs de déterminants qui semblent manquer dans les IgM soit, par rapport à la concentration des anticorps contre ces déterminants et à celles des allotypes d'IgM $Aa1^+$ et $Aa3^+$ qui en sont dépourvus, sensiblement plus faible, pour qu'on observe une zone de précipitation distincte en face des 2ème et 3ème couches de solution d'antigène et non en face de la 1ère couche (macroglobulines). On observe enfin dans la cuve D une zone de précipitation de densité faible, représentée sur le schéma, où elle est désignée par p, mais difficilement visible sur la photographie; sa signification est semblable à celle des zones m et n des cuves B et C.

Sous les réserves qui ont été exprimées, nous retiendrons de ces observations que:

– les réactions du sérum n°034 anti Ab4 ne décèlent aucune différence entre les macroglobulines et les IgG;

– les réactions des sérums anti Aa1, anti Aa2 et anti Aa3, indiquent la présence, parmi les macroglobulines, d'un allotype distinct de celui qui porte les motifs Aa1, Aa2, ou Aa3;

– les réactions du sérum anti Aa3 indiquent l'existence de déterminants allotypiques qui, portés par des macroglobulines (probablement par des IgM), manquent sur les IgG;

– les réactions des sérums anti Aa1 et anti Aa3 indiquent l'existence de déterminants allotypiques qui, portés par des IgG, manquent dans les IgM.

La nature de l'antigène qui donne la zone de précipitation particulière

aux macroglobulines n'a pas pu être étudiée d'une manière plus précise à cause de manque de matériel, mais si on tient compte du fait que ces immunsérums ont été préparés par l'injection de précipité spécifique et que l'antigene est une fraction de macroglobulines exclue sur Séphadex G200 cet antigène appartient vraisemblablement aux IgM.

En admettant qu'il en est ainsi, l'IgM qui donne une zone de précipitation avec chacun des trois immunsérums anti allotypes de différente spécificité est-elle une même IgM? Nous avons essayé de répondre à cette question par une réaction comparée (diffusion double en cuve) de la fraction de macroglobulines de MSTr avec les 3 immunsérums n°335 anti Aa1, n°216 anti Aa2, et n°212 anti Aa3 épuisés par la fraction du 2ème pic de MSTr.

Sur la photographie (planche 1, E), on observe en face de l'immunsérum n°212, une zone de précipitation dont l'inflexion vers le bas, en face de l'immunsérum n°335, signifie que les anticorps qui y participent ne se trouvent pas en quantité appréciable dans ce dernier sérum. On observe, en face de l'immunsérum n°216, une zone de précipitation qui est très vraisemblablement la zone n de la figure C (planche 1). Cette zone n'amorce aucune inflexion en regard de l'interface qui sépare les couches des sérums n°216 et n°335. Ainsi, quoique la zone m observée sur la figure B ne se voie pas clairement ici en face du sérum n°335, les choses semblent se passer comme si les anticorps qui participent à la zone de précipitation visible en face du sérum n°216 se trouvaient aussi, dans le sérum n°335 sans doute à une concentration plus faible ou sous une forme moins précipitante. Il semble donc que les immunsérums n°216 et n°335 épuisés par la fraction du 2ème pic de MSTr contiennent des anticorps contre un même motif allotypique propre aux IgM, alors que des anticorps contre le même motif ne sont pas décelés par la réaction avec le sérum n°212, qui contient au contraire des anticorps contre un motif allotypique des IgM apparemment différent du précédent.

II) La répartition des spécificités allotypiques propres aux IgM dans un échantillon de population.

a) Recherche, dans les sérums de lapins trypanosomés, des spécificités allotypiques propres aux IgM.

En vue d'étudier d'une manière plus approfondie les spécificités allo-

typiques propres aux IgM, qui ont été observées au cours de l'expérience préliminaire, nous avons préparé 11 sérums de lapins dans lesquels la quantité d'IgM était augmentée du fait de l'inoculation de *Trypanosoma equiperdum.* Ceci est illustré par la photographie A de la planche 2. On a fait réagir avec un sérum de poule anti IgM épuisé par les IgG le sérum normal et l'immunsérum de 5 saignées successives pratiquées sur le même lapin trypanosomé à 5 jours d'intervalle après l'unique injection de *Trypanosoma equiperdum.* On remarque que l'augmentation de la concentration des IgM est sensible dès la 2ème saignée c'est-à-dire celle pratiquée 10 jours après l'immunisation. La concentration des IgM atteint un maximum dans le sérum des saignées pratiquées 15 et 20 jours après l'immunisation. Dans cette étude on a choisi de travailler avec les sérums des saignées pratiquées sur les animaux après le 15ème jour et jusqu'au 25ème jour suivant l'injection de *Trypanosoma equiperdum.* Les 11 sérums de lapins préparés comprennent 3 sérums de phénotype Aa1b4, 2 sérums Aa2b4, 5 sérums Aa3b4, et 1 sérum Aa1a2b4. Nous les avons fractionnés par chromatographie d'exclusion sur Séphadex G200 et fait la réaction en milieu gélifié (diffusion double en cuve) de leurs fractions de 1er et de 2ème pic avec les 3 immunsérums anti allotypiques: n°335 anti Aa1, n°216 anti Aa2 et n°212 anti Aa3. Les réactions de chaque immunsérum avec les fractions des différents sérums qui contenaient les motifs allotypiques homologues ne différaient pas d'une manière importante d'un sérum à l'autre. Un exemple de réaction de chacun des trois immunsérums est donné planche 2, figures B, C, et D.

Dans la réaction du sérum n°335 anti Aa1 (planche 2, B) avec les deux fractions du sérum du lapin n°883, on observe une zone unique, qui est bifurquée, en regard de l'interface de deux couches d'antigène, pour donner une branche courte vers la couche de la fraction de macroglobulines.

Dans la réaction du sérum n°216 anti Aa2 (planche 2, C) avec les deux fractions du sérum du lapin n°901, on observe une seule zone, tout à fait continue en face des deux fractions; on ne distingue par conséquent pas, dans cette réaction, de différence dans la spécificité de l'antigène de ces deux fractions qui est précipité par l'immunsérum.

La réaction du sérum n°212 anti Aa3 (planche 2, D) avec les deux

Planche 2

A. Réaction montrant la variation de la concentration des IgM chez un lapin au cours de l'infection de *Trypanosoma equiperdum.*

Réaction en milieu gélifié (diffusion simple en tubes) des sérums de la saignée faite avant l'inoculation et de 5 saignées successives faites 5, 10, 15, 20 et 25 jours après l'inoculation (couche supérieure des tubes 1 à 6 respectivement) avec un immunsérum de poule anti IgM épuisé par les IgG (couche inférieure).

B, C et D. Comparaison des spécificités allotypiques de la série a portées par les IgG et les IgM.

Réaction en milieu gélifié (diffusion double en cuves à faces parallèles) de 3 sérums trypanosomés avec les sérums anti allotypiques.

Dans chaque cuve, la couche inférieure contient un sérum anti allotypique, la couche moyenne de la gélose pure, et les deux couches supérieures la fraction de macroglobulines (à gauche) et la fraction contenant les IgG (à droite) d'un sérum trypanosomé (ler et 2ème pics de Séphadex G 200).

Dans la cuve B:

couches supérieures : les fractions du sérum du lapin n°883
couche inférieure : le sérum n°335 anti Aa1

Dans la cuve C:

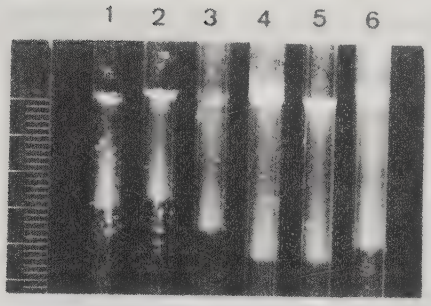
couches supérieures : les fractions du sérum du lapin n°901
couche inférieure : le sérum n°216 anti Aa2

Dans la cuve D:

couches supérieures : les fractions du sérum du lapin n°825
couche inférieure : le sérum n°212 anti Aa3

Planche 2

A

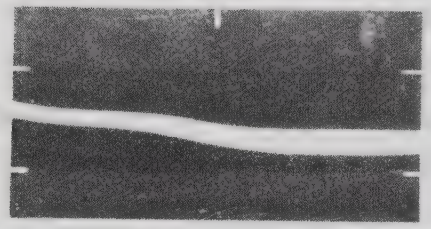


ANTI μ

B

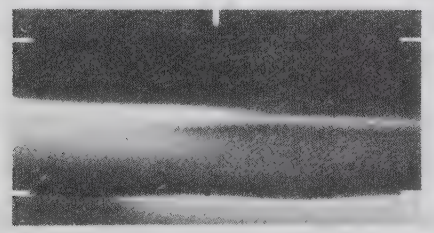
335 ANTI A1

C



216 ANTI A2

D



212 ANTI A3

fractions du sérum du lapin n°825 se manifeste par deux zones distinctes en face de chaque couche d'antigène et qui se continuent totalement. L'interprétation de ces résultats est semblable à celle de certains des résultats qui sont représentés sur la planche 1 et qui sont discutés plus haut, à l'exception de la signification de deux zones qui sont visibles dans la réaction du sérum n°212 anti Aa3 qui sera discutée dans le chapitre suivant.

Comme le montrent les trois photographies, nous n'avons pas décelé les spécificités allotypiques propres aux IgM dans les 11 sérums trypanosomés. Nous avons supposé, soit que ces spécificités manquaient dans les IgM de ces lapins, soit que les IgM possédant ces spécificités n'y étaient pas en quantité suffisante pour donner une zone de précipitation en milieu gélifié.

b) Recherche, dans des sérums de lapins normaux, des spécificités allotypiques propres aux IgM.

On a entrepris une recherche systématique, dans un certain nombre de sérums normaux pris au hasard, des allotypes propres aux IgM mis en évidence par les réactions rapportées au chapitre précédent. Dans cette recherche au moyen de réaction de précipitation à l'interface en milieu liquide (ring test), les immunsérums anti allotypiques avaient été épuisés par la fraction du mélange MSTr qui contient les IgG (fraction du 2ème pic de chromatographie d'exclusion sur Séphadex G200); ils précipitaient encore la fraction de macroglobulines de ce mélange.

Le sérum n°335 anti Aa1 épuisé a donné une réaction positive avec 14 sérums (tous sont $Aa2^+$) sur 41 sérums (32 sérums $Aa2^+$ et 9 sérums $Aa2^-$). Mais le sérum n°216 anti Aa2 épuisé n'a donné de réaction positive qu'avec 1 sérum sur 41 et le sérum n°212 anti Aa3 épuisé avec 0 sur 16. Ces derniers résultats pouvaient être dûs à la faible concentration des IgM; on a refait la réaction avec des fractions de concentration en IgM plus forte que dans les sérums, et préparées en précipitant ceux-ci par le polyéthylène glycol à 7,5%.

Le tableau 1 résume la répartition des réactions positives ou négatives des trois immunsérums ainsi épuisés avec des sérums de lapins normaux de divers génotypes pour les séries a et b ou avec les fractions préparées à partir de ces sérums en les précipitant par le polyéthylène glycol. Pour les réactions avec les immunsérums n°216 et n°212, les solutions résultant de la redisso-

TABLEAU 1

Réactions à l'interface en milieu liquide des sérums d'un échantillon de population avec trois sérums anti allotypiques épuisés par les IgG.

Spécificité allotypique de sérum		Réaction avec le sérum n°335 épuisé par IgG*			Réaction avec le sérum n°216 épuisé par IgG**			Réaction avec le sérum n°212 épuisé par IgG**		
		Nombre total de lapins examinés	+	–	Nombre total de lapins examinés	+	–	Nombre total de lapins examinés	+	–
Aa1	+	14	3	11	21	7	14	21	5	16
	–	27	11	16	31	21	10	31	14	17
Aa2	+	32	14	18	36	28	8	36	16	20
	–	9	0	9	16	0	16	16	3	13
Aa3	+	24	8	16	35	16	19	35	11	24
	–	17	6	11	17	12	5	17	8	9
Ab4	+	41	14	27	52	28	24	52	19	33
	-	0			0			0		
Ab5	+	7	3	4	8	5	3	8	3	5
	–	34	11	23	44	23	21	44	16	28
Ab6	+	0			3	0	3	3	1	2
	–	41	14	27	49	28	21	49	18	31

* couche supérieure: sérums de lapins dilués 1/2

** couche supérieure: solution de précipité du sérum par le polyéthylène glycol à 7,5% (1ml de solution correspond à environ 5-10 ml de sérum).

lution des précipités par le polyéthylène glycol ont été utilisées, car les réactions avec les sérums eux-mêmes étaient toujours négatives à une exception près. La concentration des IgM y est environ 5 à 10 fois plus forte que dans les sérums de départ. Dans les réactions avec l'immunsérum n°335, les sérums dilués au demi ont été utilisés comme solution d'antigène. On a préféré ne pas utiliser dans ces dernières réactions les fractions préparées par précipitation au polyéthylène glycol car ces fractions donnaient parfois, avec l'immunsérum n°335, des réactions de précipitation d'apparence non spécifique quoiqu'elles ne donnent pas de réactions positives avec des sérums normaux. Le risque de réactions non spécifiques n'intervient pas dans les conclusions qui seront tirées des réactions du tableau 1 car il n'est guère concevable que ces réactions présentent des relations systématiques quelconques avec la présence ou l'absence d'un motif allotypique de la série a.

On remarque que les réactions positives avec l'immunsérum n°335

épuisé, qui sont considérées comme décelant un allotype d'IgM, sont toujours rencontrées chez des lapins $Aa2^+$. Les réactions positives avec l'immunsérum n°216 épuisé se rencontrent elles aussi toujours parmi les lapins $Aa2^+$: 28 sérums sur 52 ont donné une réaction positive avec cet immunsérum et ces 28 sérums étaient tous $Aa2^+$. Mais il restait 8 sérums $Aa2^+$ parmi les 24 sérums qui étaient négatifs. D'autre part, parmi les 19 sérums sur 52, qui donnaient une réaction positive avec l'immunsérum n°212 épuisé, on n'a trouvé aucune relation systématique avec les allotypes des séries a et b. Mais à propos des résultats obtenus avec les immunsérums n°216 et n°212 dont la réaction est faite avec les solutions de précipités par le polyéthylène glycol, il faudrait considérer la possibilité d'une réaction non antigène anticorps telle que nous en avons observé avec l'immunsérum n°335; cependant cette éventualité ne saurait suffire à expliquer que la réaction positive avec l'immunsérum n°216 n'a été observée qu'avec des sérums $Aa2^+$. Cette remarque ne s'applique pas aux réactions données par l'immunsérum n°212 qui n'ont apparemment aucune correspondance systématique avec un génotype quelconque en a et en b; il semble donc prudent de considérer la signification de ces derniers résultats comme problématique. Au sujet de la signification des réactions positives des immunsérums n°335 et n°216, si l'on tient compte de la réaction en milieu gélifié représentée sur la photographie E de la planche 1, les motifs décelés par ces deux immunsérums semblent être portés par la même molécule et ont, semble-t-il, un rapport étroit avec la spécificité Aa2. Il serait à noter que la spécificité "e" décrite par OUDIN, (OUDIN 1960 II) dont l'étude n'a pas pu être poursuivie, avait elle aussi une liaison étroite avec Aa2 et que dans la préparation de l'immunsérum anti e et de l'immunsérum n°216 le même antigène immunisant avait été utilisé.

Depuis 1965, 8 spécificités allotypiques propres aux IgM ont été décrites, ou simplement signalées par d'autres auteurs (KELUS et coll. 1965; SELL 1966; KELUS 1967). Elles semblent être régies au moins par 3 allèles et une liaison génétique avec une spécificité de la série a ou de la série b a été observée pour deux spécificités: la spécificité Ms1 est toujours observée dans les sérums $Aa3^+$ et Ms3 dans les sérums $Ab4^+$ (KELUS 1967). Il sera naturellement souhaitable de tenter de savoir s'il existe des correspondances entre l'un ou l'autre de ces allotypes et ceux qui ont été observés

dans le présent travail.

III) Les "familles" des spécificités allotypiques chez les IgM et les IgG.

Les réactions de certains sérums contre les différents motifs allotypiques des séries a et b donnent naissance en milieu gélifié à deux zones de précipitation témoignant de l'existence de deux motifs allotypiques distincts portés par deux espèces moléculaires distinctes. Ceci est illustré dans le cas particulier de la spécificité Ab4 par la photographie A de la planche 1.

a) Existence de deux variantes de la spécificité allotypique Aa3 dans les IgM ainsi que dans les IgG.

Parmi les sérums anti allotypiques dont nous nous sommes servi, le sérum n°212 anti Aa3 peut lui aussi déceler deux variantes de Aa3, comme nous l'avons signalé dans le chapitre précédent (photographie D de la planche 2). L'observation de deux variantes a été faite avec 4 autres couples de préparations d'IgG et d'IgM, obtenues à partir de 4 sérums trypanosomés $Aa3^+$. Ceci est, dans un cas, illustré par la photographie B de la planche 3. Les deux zones de précipitation distinctes situées en face de la couche d'IgG sont continues, d'un côté, avec celles situées en face de la couche d'IgM et, de l'autre, avec celles situées en face de la couche du sérum total d'un lapin normal choisi au hasard comme un témoin de sérum donnant deux zones de précipitation. Ce résultat indique l'existence de deux espèces de motifs allotypiques Aa3 qui ne sont pas distingués par l'immunsérum n°212 chez les IgG et les IgM de ces sérums. Mais on a vu qu'on pouvait observer de légères différences entre les motifs Aa3 des IgG et des IgM lorsqu'ils sont révélés par ce sérum n°212 anti Aa3 (photographie D, planche 1).

Si l'on tient compte de l'interprétation donnée par HAMERS et coll. (1965, 1966, 1967) des deux zones de précipitation observées avec un sérum anti Aa1 et dont l'une serait dûe à des molécules portant un motif allotypique propre aux IgG, on pourrait imputer une des deux zones de précipitation observée avec la préparation de macroglobulines $Aa3^+$ et le sérum anti Aa3 à une contamination de cette préparation par des IgG. En fait cela n'est guère probable car cette préparation de macroglobulines ne précipite pas un sérum anti γ (spécifique des IgG) avec lequel on peut encore précipiter en milieu liquide à l'interface une solution d'IgG à 60 γ par ml. La fraction de

Planche 3

A, B et C. Comparaison des variantes de la spécificité allotypique Aa3 dans les IgM, les IgG et les fragmants Fab-γ-pap.

Réaction en milieu gélifié (diffusion double en cuves à faces parallèles).

Dans les 3 cuves, la couche inférieure contient le sérum n°212 anti Aa3 et la couche moyenne de la gélose pure. Les 3 couches supérieures contiennent:

dans la cuve A, de gauche à droite

la fraction de macroglobulines de sérum MSTr (MSTr-1)

le sérum MSTr lui-même

la fraction contenant les IgG du sérum MSTr (MSTr-2)

dans la cuve B, de gauche à droite

la fraction de macroglobulines du sérum n°819 (819-1)

la fraction contenant les IgG du sérum n°819 (819-2)

le sérum total du lapin n°827 (827-T)

dans la cuve C, de gauche à droite

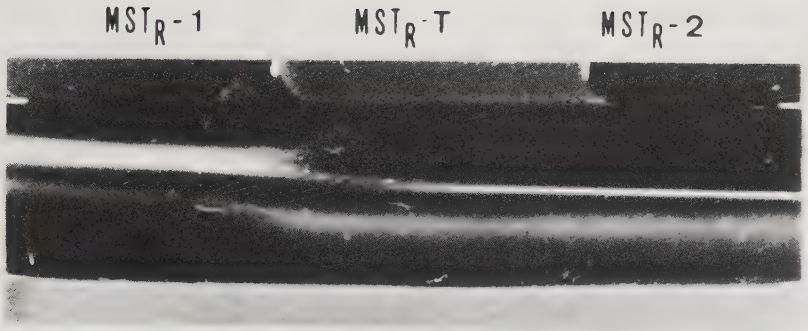
le fragment Fab-γ-pap du sérum n°904 (0,25mg/ml) (904-Fab)

les IgG du lapin n°904 (0,5mg/ml) (904-IgG)

la fraction contenant les IgG du lapin n°880 (880-2)

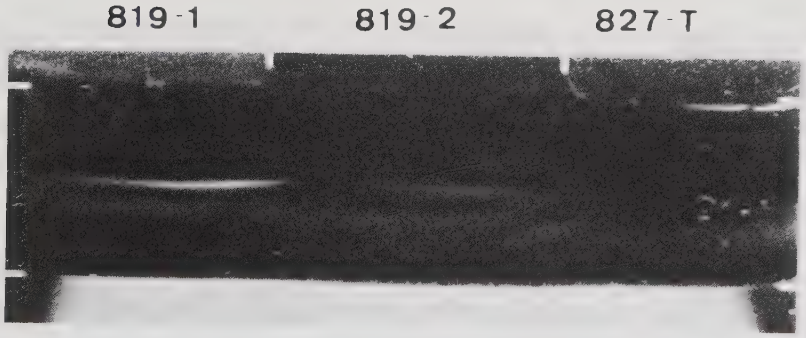
Planche 3

A



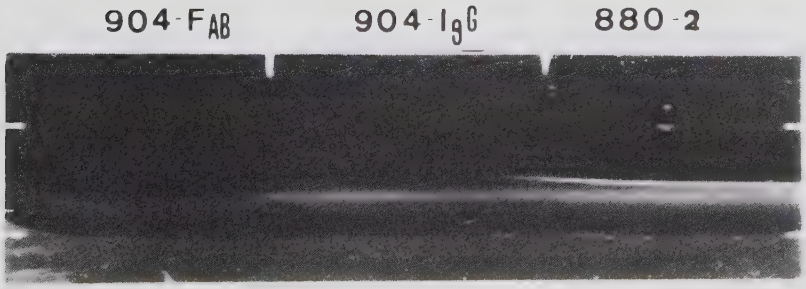
212 ANTI-A3

B



212 ANTI-A3

C



212 ANTI-A3

macroglobulines contient donc moins de 60 γ d'IgG par ml. De plus, cette solution d'IgG à 60 γ par ml est si faiblement précipitée par le sérum anti Aa3 qu'il est très vraisemblable qu'elle ne permettrait pas d'observer de réaction de précipitation en milieu gélifié avec cet immunsérum.

Le fait qu'on observe une seule zone de précipitation sur la photographie de la planche 1, D, est probablement dû à la moins bonne conservation de l'immunsérum. La conservation de l'immunsérum à −20°C ou à +4°C paraît avoir une grande importance pour ses propriétés précipitantes. En effet, dans la réaction montrée sur la planche 1, D, l'immunsérum, qui est conservé normalement à −20°C a été utilisé après un séjour à +4°C pendant 4 semaines. Lorsque cet immunsérum est utilisé immédiatement après avoir été décongelé et avec les mêmes antigènes que ceux décrits dans la réaction de la planche 1, D (à l'exception de la concentration 4 fois moins forte de la fraction de macroglobulines) deux zones bien distinctes se manifestent en face des 3 couches d'antigènes (planche 3, A). Il semblerait donc que la conservation à +4°C de cet immunsérum n°212 soit préjudiciable à certains des anticorps qu'il renferme.

L'ensemble des résultats qui ont été décrits jusqu'ici montre que: 1° la spécificité allotypique Aa3 se manifeste, chez un individu donné, sous deux variantes chez les IgG et chez les IgM, 2° le motif qui constitue une variante peut présenter certaines différences, qui ont déjà été décrites et discutées, selon que l'on considère les IgG ou les IgM.

b) Localisation sur les fragments de digestion enzymatique des IgG des déterminants qui constituent les deux variantes de la spécificité allotypique Aa3.

Les IgG du lapin n°904 de phénotype Aa3b4 ont été soumises à la digestion par la papaïne. La séparation de ces IgG digérées sur une colonne de CM cellulose est illustrée par la figure 1, et les résultats des réactions de précipitation à l'interface en milieu liquide des 3 fractions recueillies sont résumés dans la légende de la figure 1; les deux fractions de fragments Fab-γ-pap I et II donnent une réaction positive avec le sérum n°212 anti Aa3, tandis que la fraction contenant le fragment Fc ne la donne pas malgré une contamination apparente par des IgG non digérées ou Fab-γ-pap II. Un sérum de chèvre anti IgG humaine qui ne réagit qu'avec le fragment Fc de lapin, n'a

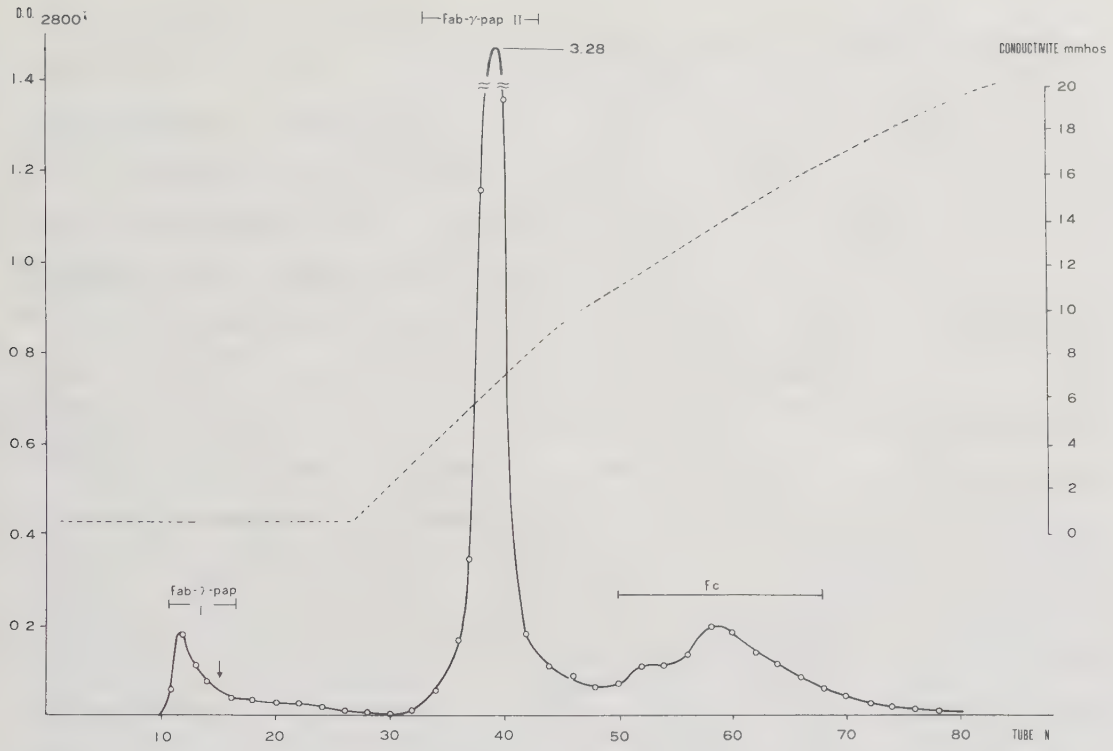


Figure 1 Chromatographie des IgG digérées par la papaïne sur une colonne de CM cellulose

Les produits digérés de 100mg d'IgG du lapin n°904 (phénotype Aa3b4) sont séparés sur une colonne de CM cellulose équilibrée avec du tampon acétate 0,01M, de pH 5,4. Le départ du gradient de concentration est indiqué par une flèche. (Diamètre de la colonne: 2,7cm; Hauteur de la colonne: 17,5cm; Vitesse de l'élution: 30 ml/heure; Volume d'une fraction: 10 ml/tube). Les deux premières fractions contiennent les fragments Fab-γ-pap I et Fab-γ-pap II respectivement. Le rapport des 2 fragments est 7/93. Le 3ème accident contient le fragment Fc; son épaulement serait dû à des IgG non digérées. Les résultats des réactions, en milieu liquide à l'interface, avec un sérum anti Fab, un sérum anti IgG humaine et des sérums anti allotypiques, sont résumés ci-dessous.

	1er pic	2è pic	3è pic
le sérum de chèvre anti Fab	++	++	+
le sérum de chèvre anti IgG humaine	–	–	++
le sérum n°212 anti Aa3	+	+	–
le sérum n°034 anti Ab4	++	++	+

Les signes ++. + et – indiquent respectivement une réaction fortement positive, une réaction positive et une réaction négative.

pas permis d'observer de contamination de la fraction Fab-γ-pap II par le fragment Fc ou des IgG non digérées.

Sur la figure C de la planche 3, on distingue 2 zones de précipitation en face de la couche 880-2 (on désigne par 880-2, la 2ème fraction de filtration sur Séphadex G200 du sérum du lapin n°880 qui renferme les IgG et qui est choisie comme témoin de fraction d'IgG présentant deux zones de précipitation avec l'immunsérum n°212). Ces deux zones se retrouvent en face de la couche 904-IgG (IgG purifiées à partir du sérum n°904) la 2ème étant moins dense qu'en face de la couche 880-2. On observe une seule zone en face de la couche 904-Fab, sa densité étant plus faible que celle de la zone correspondante en face de 904-IgG quoique sa position soit plus proche de la couche d'anticorps. Les deux zones en face des deux couches de droite sont vraisemblablement dûes à deux motifs jumelés Aa3′ et Aa3″ portés par des régions variables de chaînes lourdes appartenant à deux sous-classes différentes (OUDIN 1968). La zone unique en face de 904-Fab est vraisemblablement dûe à un fragment Fab contenant une des deux sous-classes de régions variables. Ce fragment Fab est moins précipitant qu'IgG. Il est concevable que le fragment Fab de l'autre sous-classe soit encore moins précipitant de sorte qu'on ne voit pas la zone correspondante.

IV) Les différences de spécificité entre les motifs allotypiques de la série a portés par les IgG et par les IgM; l'existence, au sein de ces motifs allotypiques, de déterminants antigéniques propres à l'une ou à l'autre des deux classes d'immunoglobulines.

Une différence entre le motif allotypique Aa1 des IgG et celui des IgM s'est manifestée par une bifurcation de la zone principale de précipitation dans la réaction en milieu gélifié du sérum n°335 anti Aa1 avec le mélange de sérums de lapins trypanosomés MSTr (planche 1, B) et avec un autre sérum trypanosomé homozygote pour Aa1 (planche 2, B). Cette différence montre que certains déterminants allotypiques des IgG manquent sur les IgM. Ces déterminants allotypiques sont-ils toujours liés aux motifs Aa1? Afin de répondre à cette question, nous avons fait le typage de sérums normaux par l'une ou l'autre des deux techniques suivantes:

1° la réaction de précipitation à l'interface en milieu liquide de l'immunsérum n°335 épuisé par des IgM Aa1$^+$, avec des sérums normaux dilués à 1/10 dans l'eau salée à 0,9%. Après avoir été épuisé par les IgM du lapin n°883, dont la réaction en milieu gélifié avec l'immunsérum n°335 est représentée planche 2, B, l'immunsérum n°335 ne réagit plus avec ces IgM, ni avec d'autres préparations d'IgM qui proviennent de lapins Aa1$^+$ mais il réagit encore avec les IgG et le sérum total du même lapin. Ainsi peut-on examiner par une réaction semblable si un sérum quelconque contient un antigène possédant les déterminants allotypiques en question des IgG.

2° l'inhibition de l'agglutination des hématies de mouton sensibilisées par les fragments Fab préparés en digérant par la papaïne les IgG d'un sérum Aa1$^+$ anti hématies de mouton. On verra plus loin (et figure 6) que la précipitation des IgG Aa1$^+$ par le sérum anti Aa1 n°335 peut être complètement inhibée par une préparation de fragments Fab-γ-pap de ces IgG; d'ou l'on conclut que le fragment Fab-γ-pap semble posséder tous les déterminants antigéniques décelables au moyen de l'immunsérum n°335 que possède l'IgG native. Par conséquent, l'agglutination provoquée par la réaction de Fab-γ-pap Aa1$^+$ anti hématies, fixés sur des hématies de mouton, avec l'immunsérum n°335 doit pouvoir être inhibée par un antigène qui possède tous les déterminants antigéniques du motif Aa1 des IgG mais ne peut vraisemblablement pas être inhibée par un antigène qui manque d'une partie de ces déterminants, par exemple les IgM. C'est en effet ce qu'on observe. Dans les conditions décrites au chapitre des méthodes, l'agglutination par le sérum n°335 anti précipité spécifique Aa1$^+$ des hématies sensibilisées, est inhibée par un sérum normal de phénotype Aa1b4 jusqu'à une dilution de 1/80, alors qu'elle n'est pas inhibée par des sérums normaux Aa1$^-$ dilués à 1/10, ni par une solution d'IgM Aa1$^+$ à 10mg/ml environ. Il semble que l'"homoréactant" décrit par MANDY et coll. (1965) n'intervienne pas dans les réactions d'agglutination effectuées dans ces conditions.

Parmi 133 sérums normaux examinés, 44 sérums l'ont été par la première technique (précipitation) et 89 sérums par la deuxième technique (inhibition de l'agglutination). Les résultats sont résumés sur le tableau ci-dessous.

1) La réaction à l'interface en milieu liquide

	Nombre de sérums examinés	précipitation positive	précipitation négative
sérums normaux Aa1$^+$	15	15	0
sérums normaux Aa1$^-$	29	0	29

2) Le test d'inhibition de l'agglutination

	Nombre de sérums examinés	inhibition positive	inhibition négative
sérums normaux Aa1$^+$	87	87	0
sérums normaux Aa1$^-$	2	0	2

Pour résumer les résultats obtenue par les deux techniques, 102 sérums Aa1$^+$ sur 102 possèdent les déterminants antigéniques cherchés et 31 sérums Aa1$^-$ sur 31 ne les possèdent pas; cela signifie apparemment que l'existence des déterminants allotypiques dont il s'agit est étroitement liée à celle du motif allotypique Aa1. Il est très vraisemblable que ces déterminants sont liés à la spécificité isotypique de la chaîne γ et qu'ils constituent une partie du motif allotypique Aa1 des IgG.

Puisque le sérum n^{0}335 anti Aa1 a été préparé par l'injection de précipité spécifique préparé à partir d'un immunsérum prélevé chez un animal hyperimmunisé, dont les anticorps appartenaient sans doute essentiellement aux IgG, on peut supposer que, s'il existe des déterminants allotypiques propres aux IgM, cet immunsérum doit être peu apte à les déceler. Donc, dans le but de déceler les motifs allotypiques propres aux IgM, on a immunisé des lapins (phénotype Aa2a3b4) avec des IgM purifiées à partir du sérum trypanosomé n^{0}883 (phénotype Aa1b4). On a ainsi préparé un immunsérum n^{0}003 dont la réaction comparée avec les fractions des IgM purifiées (883-IgM) et la 2ème fraction de chromatographie d'exclusion sur Séphadex G200 du

sérum ayant fourni le matériel immunisant (883-2) est représentée sur la photographie A de la planche 4. On observe une zone de précipitation dense et large qui est bifurquée en regard de l'interface des deux couches supérieures, une branche de la bifurcation étant dirigée vers la couche de la solution d'IgG. Elle manifeste une réaction croisée qui indique que certains déterminants antigéniques des IgM manquent sur les IgG. On remarque en face de la couche d'IgM une autre zone de précipitation qui est beaucoup plus faible et un peu plus proche de la couche d'antigène que la précédente. Cette zone semble dûe, comme les zones de précipitation semblables signalées plus haut, à un antigène différent de celui qui porte le motif Aa1; mais l'immunsérum n'a plus donné cette zone de précipitation après quelques semaines de conservation à +4°C et l'étude concernant cette zone n'a pu être poursuivie. Nous avons poursuivi l'étude de la zone principale qui persistait en face de la couche 883-IgM en nous servant du sérum de deux autres saignées (VII et IX).

La réaction de précipitation en milieu gélifié de l'immunsérum de la saignée IX est montrée sur la photographie B de la planche 4. A première vue, cet immunsérum donne une réaction en quelque sorte inverse de celle de l'immunsérum n°335, puisqu'il permet de déceler des déterminants allotypiques propres aux IgM, apparemment portés par les mêmes molécules d'IgM que le motif Aa1. Mais l'immunsérum 003 possède certaines particularités. Il semblerait que les propriétés précipitantes des anticorps à l'égard des IgG $Aa1^+$ varient avec l'immunsérum des diverses saignées alors qu'elles paraissent très peu changées pour ce qui est des IgM $Aa1^+$. Alors que l'immunsérum 003 de la saignée VI donne une zone de précipitation très nette en face de la couche 883-2 (planche 4, A) ceui de la saignée IX pratiquée 12 semaines après la précédente (intervalle durant lequel l'animal a reçu une nouvelle injection de matériel immunisant) ne permet plus de distinguer cette zone de précipitation en face de la couche 883-2 (planche 4, B); elle est remplacée par une bifurcation orientée vers le bas c'est-à-dire vers la source d'anticorps. Tout se passe comme si l'immunsérum 003 de la saignée IX s'était appauvri en anticorps dirigés contre les déterminants $Aa1^+$ communs aux IgG et aux IgM ou comme si les anticorps étaient devenus moins précipitants à

Planche 4

A. Comparaison de la spécificité allotypique Aa1
dans les IgM et les IgG.

Réaction en milieu gélifié (diffusion double en cuves à faces parallèles) des IgM et des IgG avec le sérum n°003 anti IgM $Aa1^+$

couches supérieures: à gauche, les IgM purifiées du lapin n°883 (883-IgM) à 2 mg/ml, à droite, la fraction contenant les IgG du même lapin (le 2ème pic du fractionnement sur Séphadex G200) (883-2)

couche moyenne: la gélose pure

couche inférieure: le sérum n°003 anti IgM $Aa1^+$ de la saignée VI.

B. C et D. Comportement particulier du motif allotypique
Aa1 propre aux IgM.

Réaction en milieu gélifié (diffusion double en cuves à faces parallèles) des IgM et des IgG avec l'immunsérum n°003, avant (B) et après (C et D) son épuisement par les IgG.

couches supérieures: dans les cuves B et C, de gauche à droite les IgM purifiées du lapin n°883 à lmg/ml((883-IgM) et la fraction de sérum du même lapin qui contient les IgG (le 2ème pic de Séphadex G200: 883-2)

couche moyenne: la gélose pure

couche inférieure:

dans la cuve B: l'immunsérum n°003 de la saignée IX non épuisé

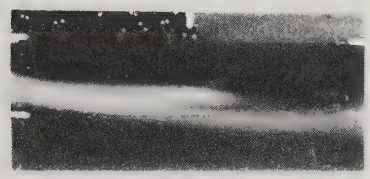
dans la cuve C: l'immunsérum n°003 de la saignée IX, épuisé par des IgG à l'équivalence.

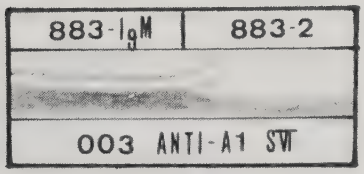
couches supérieures dans la cuve D: de gauche à droite les IgM seules et les IgM mélangées à des quantités croissantes d'IgG. La concentration des IgM est constante 1 mg/ml dans les 5 couches et celles de IgG sont 0 (couche 1), 1/64 mg/ml (couche 2), 1/16 mg/ml (couche 3), 1/4 mg/ml (couche 4) et 1 mg/ml (couche 5)

couche moyenne: la gélose pure

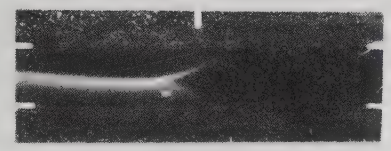
couche inférieure: l'immunsérum n°003 de la saignée IX, épuisé par les IgG à l'équivalence.

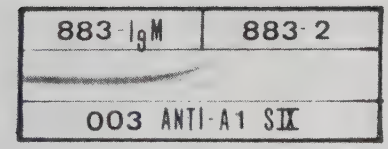
Planche 4



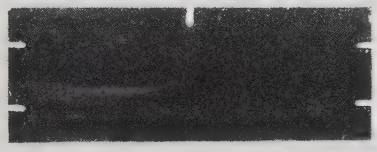


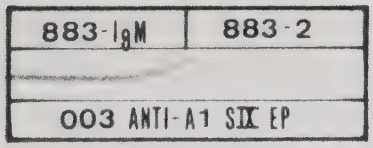
A



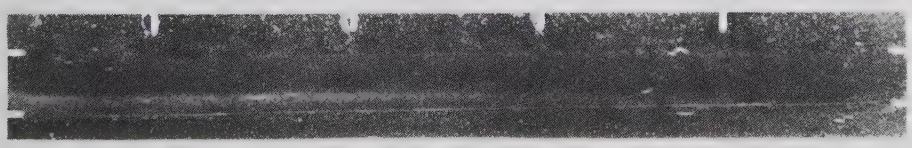


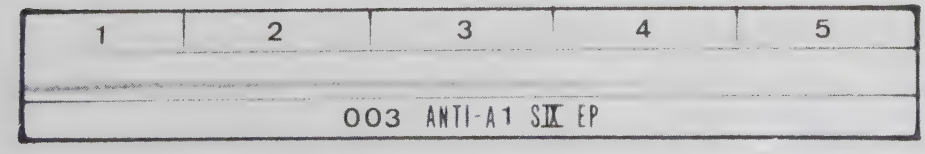
B





C





D

l'égard de ces déterminants. Il n'a pas été possible de déterminer si ce phénomène était imputable à la réaction de l'animal immunisé ou au seul vieillissement de l'immunsérum (l'immunsérum de la saignée IX a été conservé plus longtemps à +4°C que celui de la saignée VI avant d'être étudié en milieu gélifié). Les effets de l'épuisement de l'immunsérum n°003 de la saignée IX par les IgG sont notablement différents des résultats de l'épuisement de l'immunsérum n°335 par les IgM. Tandis que l'immunsérum n°335 épuisé par un excès d'IgM précipite encore les IgG, l'immunsérum n°003 épuisé par un excès d'IgG ne précipite plus les IgM (tableau 2). Dans la réaction en milieu gélifié (diffusion double en cuve) de l'immunsérum n°003, épuisé par les IgG à l'équivalence, avec les IgM et avec la fraction qui contient les IgG du lapin 883, on observe une zone de précipitation des IgM sans réaction décelable avec les IgG (planche 4, C). On peut comparer cette réaction avec celle montrée sur la photographie B de la planche 4, dans laquelle le même immunsérum non épuisé réagit avec les mêmes antigènes; la bifurcation orientée vers le bas qui est imputable aux déterminants communs a disparu après l'épuisement. Une autre réaction en cuve (planche 4, D) dans laquelle les réactifs suivants sont mis en présence: IgM seule (couche supérieure 1), IgM mélangée à des quantités croissantes d'IgG (couches supérieures 2 à 5) et immunsérum n°003 épuisé par IgG (couche inférieure) montre l'effet inhibiteur des IgG sur la réaction de précipitation des IgM avec cet immunsérum; la zone de précipitation disparaît en face des IgM qui ont été mélangées à une forte concentration d'IgG. Ces résultats semblent indiquer que l'immunsérum n°003 peut déceler des déterminants allotypiques qui sont propres aux IgM mais qui ont une forte ressemblance structurale avec ceux des IgG.

On a cherché à savoir si l'existence de ces déterminants antigéniques était liée à celle des motifs Aa1, au moyen de la réaction des IgM purifiées de plusieurs sérums avec l'immunsérum n°003 épuisé par les IgG à l'équivalence, qui donne encore une réaction positive avec les IgM. Le résultat était que 6 IgM $Aa1^+$ sur 6 donnaient une réaction positive alors que 8 IgM $Aa1^-$ sur 8 donnaient une réaction négative. Quant aux sérums normaux, 24 sérums normaux $Aa1^-$ sur 24 et 11 sérums normaux $Aa1^+$ sur 11 donnaient une réaction négative. Ce dernier résultat s'explique par l'inhibition dûe à l'excès

TABLEAU 2

Effet de l'épuisement, par des IgG Aa1$^+$, du sérum n°003 anti IgM Aa1$^+$

Volume de sérum n°003 anti IgM Aa1$^+$	0,1ml constant							
Poids (en mg) d'IgG Aa1$^+$ ajoutée (sous un volume de 0,1ml)	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1,5}{160}$	$\frac{2,0}{160}$	$\frac{3,0}{160}$	$\frac{4,0}{160}$	$\frac{8,0}{160}$	$\frac{16,0}{160}$
Réaction de précipitation en milieu liquid à l'interface du surnageant avec								
IgG Aa1$^+$	+	+	–	–	–	–	–	–
IgM Aa1$^+$	+	+	+	–	–	–	–	–
sérum anti Aa1	–	–	–	–	+	+	+	+

Effet de l'épuisement, par des IgM Aa1$^+$, du sérum n°335 anti précipité spécifique Aa1$^+$

Volume de sérum n°335 anti précipité spécifique Aa1$^+$	0,1ml constant				
Poids (en mg) d'IgM Aa1$^+$ ajoutée (sous un volume de 0,1ml)	$\frac{1}{80}$	$\frac{2}{80}$	$\frac{4}{80}$	$\frac{8}{80}$	$\frac{16}{80}$
Réaction de précipitation en milieu liquide à l'interface du surnageant avec					
IgM Aa1$^+$	+	+	–	–	–
IgG Aa1$^+$	+	+	+	+	+
sérum anti Aa1	–	–	±	+	+

Les signes +., ±, et – indiquent respectivement en milieu liquide à l'interface une réaction positive, une réaction faible et une réaction négative.

d'IgG Aa1$^+$. On peut donc interpréter ces résultats de la façon suivante: l'existence de ces déterminants allotypiques semble étroitement liée à la fois à l'existence des structures qui sont causes de la spécificité isotypique des IgM et à l'existence du motif allotypique Aa1.

V) La comparaison du pouvoir inhibiteur des sous-unités d'IgM et des fragments de digestion d'IgG et d'IgM dans la précipitation des molécules intactes par les sérums anti allotypiques.

On a cherché à compléter les résultats décrits au chapitre précédent et principalement obtenus au moyen de la précipitation des molécules intactes en milieu gélifié, par une étude des propriétés précipitantes et le cas échéant des propriétés inhibitrices des fragments préparés à partir des IgG et des IgM.

Nous avons soumis les IgG et les IgM à la réduction et à la digestion enzymatique comme cela a été décrit dans le chapitre des méthodes. Après réduction et alkylation des IgM, on obtient une sous-unité dont la structure est considérée comme semblable à celle d'IgG en ce qu'elle est constituée de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères. Au moyen de la digestion des IgM par la trypsine et des IgMs par la papaïne, on peut obtenir des fragments composés d'une chaîne légère et d'une partie d'une chaîne lourde, dont les caractères physicochimiques et immunologiques sont semblables. On les appellera Fab-μ-try et Fab-μ-pap respectivement. De même, au moyen de la digestion des IgG par la trypsine on peut obtenir un fragment semblable à celui qu'on obtient au moyen de leur digestion par la papaïne. On appellera ces fragments respectivement Fab-γ-try* et Fab-γ-pap*. Des exemples de séparation de ces fragments par chromatographie d'exclusion ou chromatographie sur échangeurs d'ions sont illustrés sur les figures 1, 2, 3 et 4. Après filtration sur Séphadex G200 des IgG digérées par la trypsine on a recueilli la fraction qui est éluée dans la zone qui correspond au volume d'élution du fragment Fab-γ-pap. Cette fraction dénommée P.D. (pour produits digérés) sur la figure 2 a été étudiée en milieu gélifié (diffusion double en cuve).

---

* Les études ont porté principalement sur le fragment FabII qui était le plus abondant. Donc, par Fab-γ-try et Fab-γ-pap nous entendrons en fait FabII. Quand le fragment FabI sera utilisé, nous le signalerons.

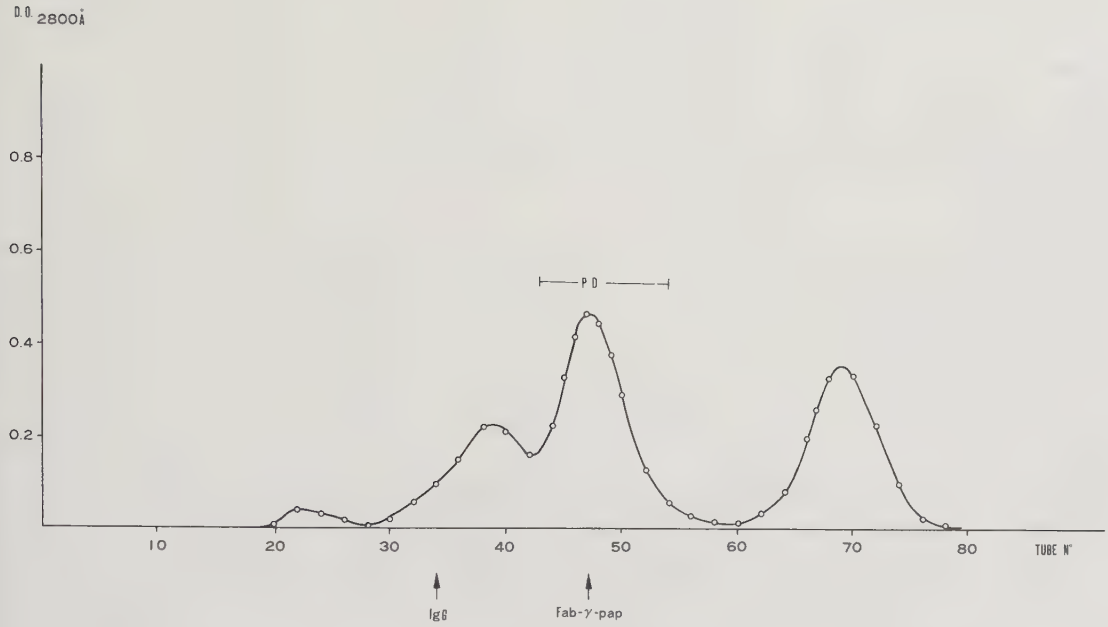


Figure 2. Fractionnement des IgG digérées par la trypsine sur une colonne de Séphadex G200.

9,1mg d'IgG du lapin trypanosomé n°883, ont été réduites et alkylées, puis digérées par la trypsine durant 6 heures, et les produits digérés ont été séparés sur une colonne de Séphadex G200 équilibrée avec du tampon Tris HCl 0,1M, de pH 8,0. (Diamètre de la colonne: 1,5cm; Hauteur de la colonne: 89cm; Vitesse de l'élution: 10ml/heure; Volume d'une fraction: 2 ml/tube). Les positions d'élution des IgG et du fragment Fab-γ-pap sont indiquées par des flèches. Les produits élués aux environs de la position d'élution de Fab-γ-pap (P.D.) sont recueillis, concentrés et purifiés par chromatographie sur CM cellulose pour obtenir les fragments Fab-γ-try. Le dernier accident de la courbe de densité optique est relatif aux menus peptides.

Sur la photographie A de la planche 5 on observe 2 zones de précipitation avec un immunsérum de mouton anti IgG de lapin en face de la couche P.D. La première est continue avec celle que l'on observe en face de Fab-γ-pap tandis que la deuxième ne s'observe qu'en face de la couche P.D. Cette deuxième zone de précipitation a été interprétée comme représentant une contamination du fragment Fab-γ-try contenu dans la fraction P.D. par des IgG non hydrolysées par exemple. Après passage de cette fraction P.D. sur une colonne de C.M. cellulose le fragment Fab-γ-try purifié ne présentait plus (en milieu gélifié diffusion double en cuve) avec le sérum anti IgG

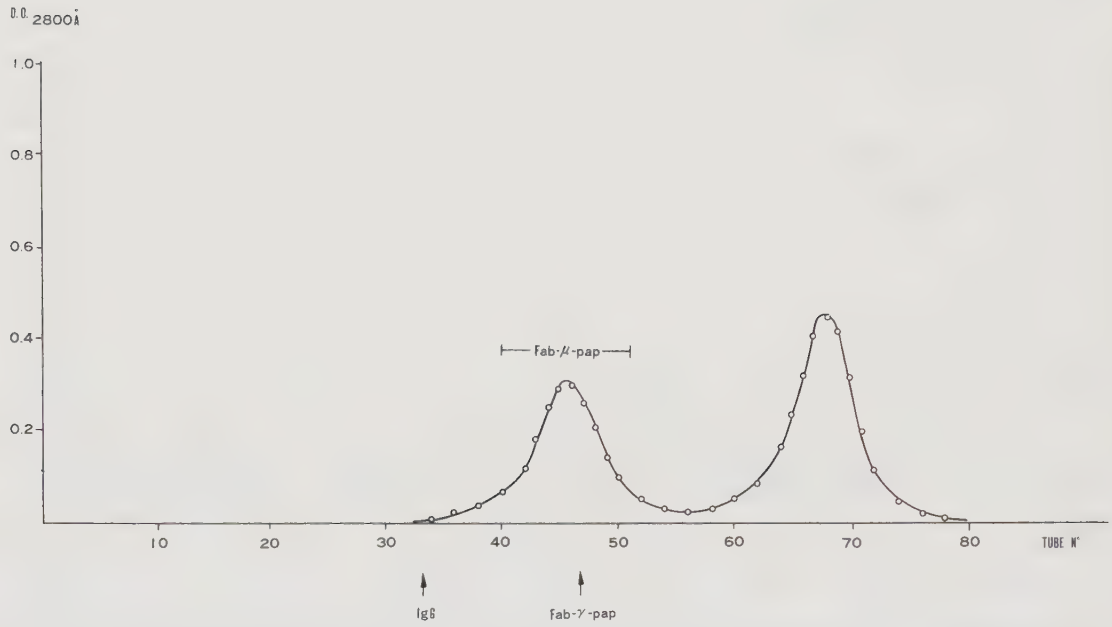


Figure 3. Fractionnement des IgMs digérés par la papaïne sur une colonne de Séphadex G200

8,1mg d'IgMs du lapin trypanosomé n°911, digérées par la papaïne durant 4 heures, ont été fractionnées sur une colonne de Séphadex G200 équilibrée avec du tampon Tris HCl 0,1M, de pH 8,0. (Diamètre de la colonne: 1,5cm; Hauteur de la colonne: 89cm; Vitesse de l'élution: 12 ml/heure; Volume d'une fraction: 2 ml/tube). Les positions d'élution des IgG et des fragments Fab-γ-pap sont indiquées par des flèches. La 1ère fraction (Fab-μ-pap) représente 41,6% de la densité optique totale tandis que la 2ème fraction (menus peptides) en représente 58,4%.

qu'une seule zone de précipitation parfaitement continue avec celle de Fab-γ-pap (planche 5, B).

Les réactions de précipitation en milieu gélifié (diffusion double en cuve à faces parallèles) des fragments Fab-γ-pap et Fab-γ-try avec un sérum de chèvre anti IgG de lapin et celles des fragments Fab-μ-pap et Fab-μ-try avec un sérum de poule anti IgM de lapin sont aussi illustrées sur les photographies B et C de la planche 5 respectivement. Sur la photographie B on observe une seule zone continue en face des couches de deux fragments Fab-γ-pap et Fab-γ-try. D'autre part, elle croise d'un côté une zone donnée par le fragment Fc et de l'autre elle semble se bifurquer à peine en face de la

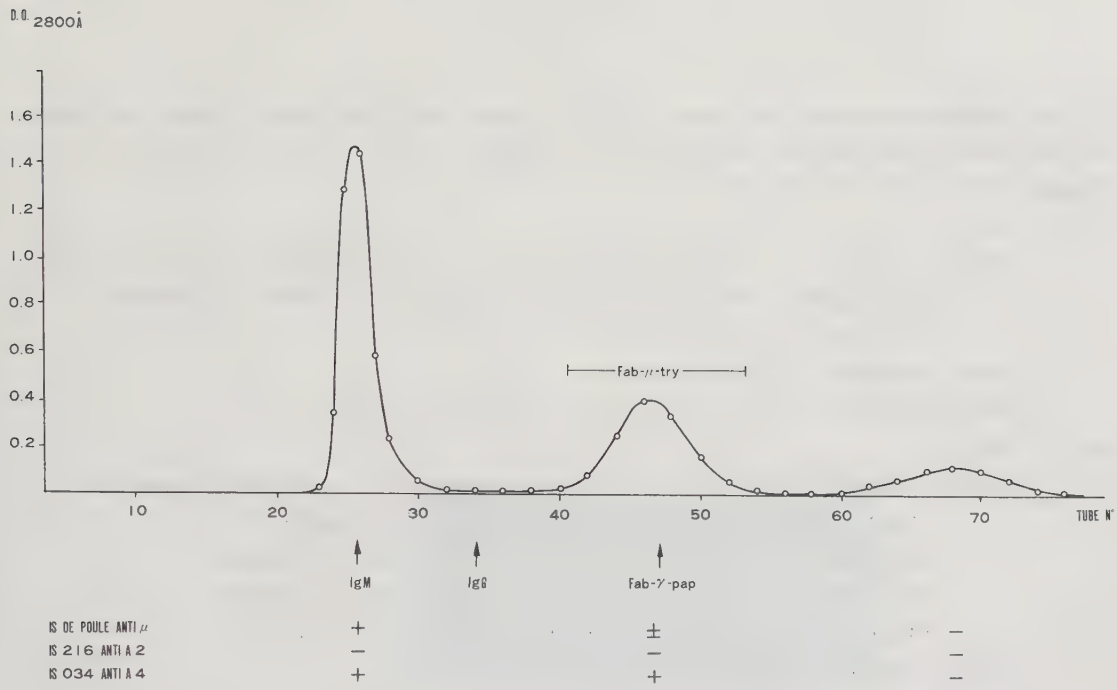


Figure 4. Fractionnement des IgM digérées par la trypsine sur une colonne de Séphadex G200.

9,3mg d'IgM du lapin trypanosomé n°804 (phénotype Aa2b4) ont été digérées par la trypsine durant 19 heures et les produits digérés ont été fractionnés sur une colonne de Séphadex G200 équilibrée avec du tampon HCl 0,1M de pH 8,0. (Diamètre de la colonne: 1,5cm; Hauteur de la colonne: 89cm; Vitesse de l'élution: 10 ml/heure; Volume d'une fraction: 2 ml/tube). Les positions d'élution des IgM, des IgG et des fragments Fab-γ-pap sont indiquées par des flèches. Le pourcentage de densité optique des trois fractions obtenues est le suivant: 1er pic (IgM hydrolysées partiellement) : 52,8% ,
2ème pic (fragment Fab-μ-try) : 33,4% ,
3ème pic (menus peptides) : 13,8% .
Les résultats des réactions de précipitation en milieu liquide à l'interface avec un sérum anti μ et des sérums anti allotypiques sont présentés au-dessous du graphique. Les signes +, ± et – indiquent respectivement une réaction positive, une réaction faible et une réaction négative.

couche de chaînes légères. Sur la photographie C on observe une zone unique et continue en face des couches de deux fragments Fab-μ-pap et Fab-μ-try. Cette zone croise d'un côté avec une zone située en face de la couche contenant les chaînes lourdes μ et de l'autre elle se bifurque en donnant une branche vers la couche des chaînes légères.

Planche 5

A et B. Réaction comparée en milieu gélifié (diffusion double en cuves à faces parallèles) des fragments d'IgG obtenus par digestion enzymatique (par la papaïne ou par la trypsine) avec un sérum anti IgG.

Dans la cuve A

couches supérieures à gauche: la fraction "P.D." (fraction éluée sur Séphadex G200 à la position effluente de Fab-γ-pap; figure 2), à droite: le fragment Fab-γ-pap (0,1mg/ml)

couche moyenne: la gélose pure

couche inférieure: le sérum de mouton anti IgG de lapin

Dans la cuve B

couches supérieures: de gauche à droite: les fragments Fc préparés à partir du mélange des IgG des lapins n°884 et n°885 (0,2mg/ml)

les fragments Fab-γ-try des IgG du lapin n°883 (0,1mg/ml)

les fragments Fab-γ-pap des IgG du lapin n°883 (0,1mg/ml)

les chaînes légères des IgM du lapin n°892 (0,15mg/ml)

couche moyenne: la gélose pure

couche inférieure: le sérum de chèvre anti IgG de lapin

C. Réaction comparée en milieu gélifié (diffusion double en cuve à faces parallèles) des fragments d'IgM obtenus par digestion enzymatique (trypsine et papaïne) avec un sérum anti IgM.

couches supérieures: de gauche à droite

les chaînes μ des IgM du lapin n°892 (0,3mg/ml)

les fragments Fab-μ-try des IgM du lapin n°911 (0,1mg/ml)

les fragments Fab-μ-pap des IgM du lapin n°911 (0,1mg/ml)

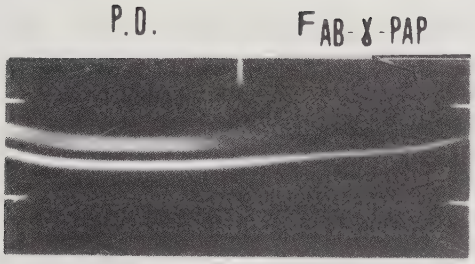
les chaînes légères des IgM du lapin n°892 (0,15mg/ml)

couche moyenne: la gélose pure

couche inférieure: le sérum de poule anti IgM de lapin

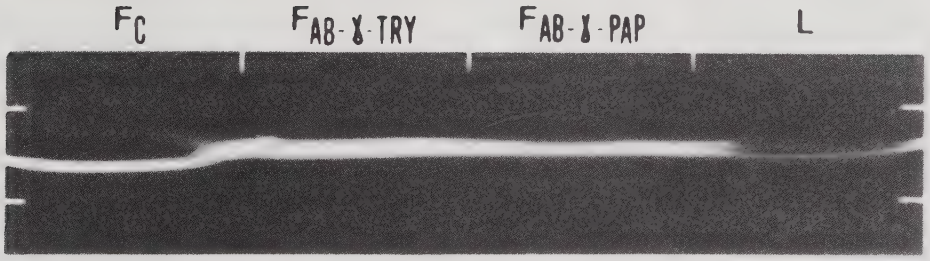
Planche 5

A



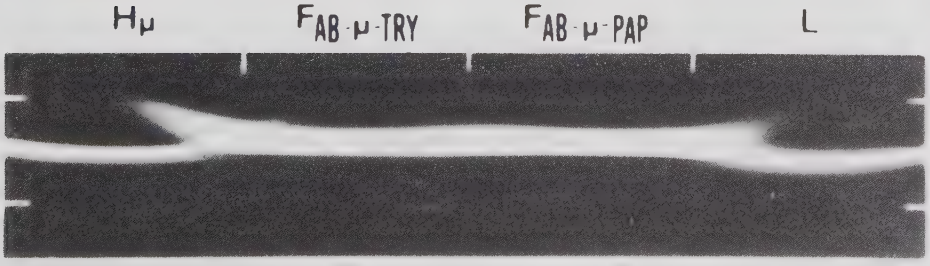
ANTI-I_gG

B



ANTI-I_gG

C



ANTI-I_gM

Ces réactions ne permettent de distinguer, au point de vue de leurs spécificités isotypiques, Fab-γ-pap de Fab-γ-try d'une part et Fab-μ-pap de Fab-μ-try d'autre part. De plus elles confirment que les déterminants antigéniques des fragments Fab-γ sont différents de ceux du fragment Fc et que ces fragments qui portent tous les déterminants des chaînes légères ont aussi des déterminants que l'on ne trouve pas sur ces chaînes (planche 5, B). De même les fragments Fab-μ-try et Fab-μ-pap portent quelques déterminants antigéniques des chaînes Hμ et ils ont aussi des déterminants antigéniques que l'on ne trouve pas sur ces chaînes (planche 5, C). La comparaison des caractères antigéniques des fragments Fab-μ-try et Fab-μ-pap avec les chaînes légères appellent les mêmes remarques que celles formulées pour les fragments Fab-γ-pap et -try et les mêmes chaînes légères.

On remarque sur le tableau 3, où sont résumés les résultats de l'étude des réactions de précipitation en milieu liquide à l'interface, que les préparations d'IgMs et de Fab-μ-try des 3 allotypes de la série a ainsi que celles de Fab-μ-pap des allotypes Aa1 et Aa2 ne précipitent pas avec les sérums anti allotypiques appropriés, que les préparations de Fab-γ (-pap et -try) de l'allotype Aa1 ne précipitent pas non plus, tandis que celles de Fab-γ-pap des allotypes Aa2 et Aa3 précipitent avec les immunsérums correspondants.

a) L'inhibition de la précipitation du système Aa1 anti Aa1.

Pour essayer de savoir si les non-précipitabilités que nous venons de signaler sont imputables à des modifications ou à des pertes de déterminants allotypiques de la série a intervenues à la suite de la digestion enzymatique ou de la réduction, on a étudié quantitativement l'inhibition, par les fragments et les sous-unités, de la précipitation dans les deux systèmes suivants: IgM Aa1$^+$ sérum n^{0}003 anti IgM Aa1$^+$, IgG Aa1$^+$ sérum n^{0}335 anti précipité spécifique Aa1$^+$. Le pouvoir inhibiteur des sous-unités et des fragments a été comparé aux points de vue du degré de l'inhibition maximum et de la quantité nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition.

La figure 5 montre les résultats du teste d'inhibition quantitatif par IgMs, Fab-μ-pap, Fab-μ-try et Fab-γ-pap dans le système IgM Aa1$^+$ sérum

TABLEAU 3

Réactions de précipitation des fragments d'IgG et d'IgM Aa1$^+$, Aa2$^+$ et Aa3$^+$ avec les sérums anti allotypiques correspondants.

Immunsérums précipitants	IgM et leurs fragments				IgG et leurs fragments		
	IgM	IgMs	Fab-μ-try	Fab-μ-pap	IgG	Fab-γ-pap	Fab-γ-try
Sérum anti IgM Aa1$^+$ n^{0}003	+	–	–	–	±	–	–
Sérum anti précipité spécifique Aa1$^+$ n^{0}335	+	–	–	–	+	–*	–
Sérum anti précipité spécifique Aa2$^+$ n^{0}216	+	–	–	–	+	±	...
Sérum anti précipité spécifique Aa3$^+$ n^{0}212	+	–	–	...	+	±	...
Sérum anti précipité spécifique Ab4$^+$ n^{0}034	+	+	+	+	+	+	+

Les signes +, ± et – indiquent respectivement en milieu liquide à l'interface une réaction positive, une réaction faible et une réaction négative. Le symbol ... est utilisé lorsque les fragments n'ont pas été étudiés.

* Les deux fragments Fab-γ-pap c'est-à-dire Fab-γ-pap I et Fab-γ-pap II présentent une réaction négative. Le fragment Fab-γ-pap II ne précipite non seulement l'immunsérum n^{0}335 mais aussi 5 autres sérums anti Aa1 qui ont été étudiés.

La concentration des solutions des protéines intactes et de leurs fragments se situe entre 0,2 et 0,5mg/ml.

n^{0}003 anti IgM Aa1$^+$. La sous-unité IgMs et le fragment Fab-μ-pap inhibent presque complètement la précipitation. Par contre, les fragments Fab-μ-try et Fab-γ-pap ne l'inhibent qu'aux environs de 75% et 85% respectivement. La concentration de sous-unités ou de fragments nécessaire pour obtenir 50% d'inhibition est 0,53 μM pour IgMs, 0,90 μM pour Fab-μ-pap, 1,10 μM pour Fab-γ-pap et 1,68 μM pour Fab-μ-try (tableau 4). Le pouvoir inhibiteur d'IgMs est donc à peu près le double de celui de Fab-μ-pap ou Fab-γ-pap et le triple de celui de Fab-μ-try.

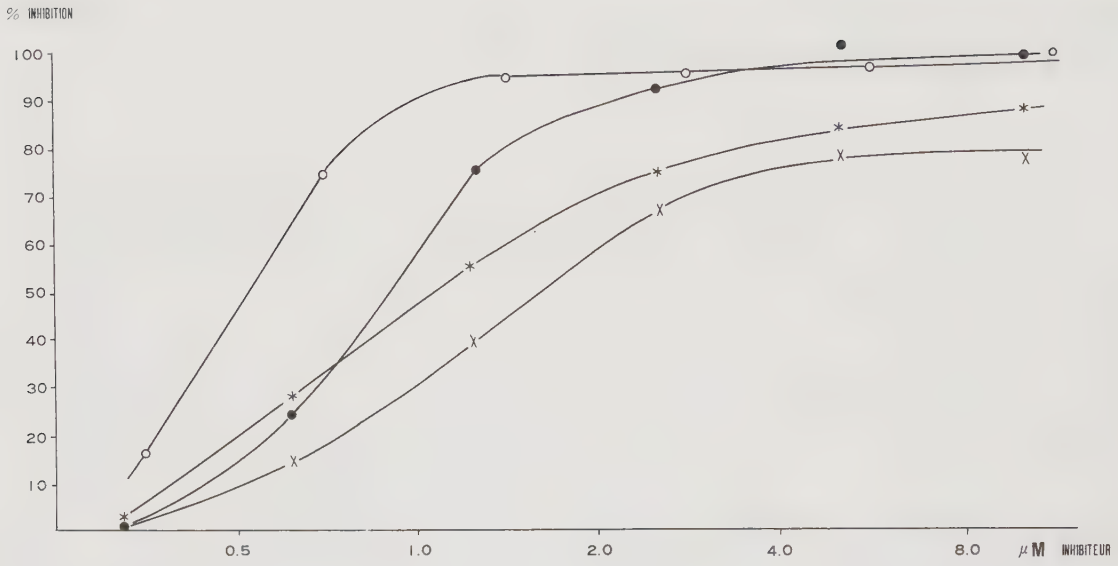


Figure 5 Inhibition de la précipitation du système IgM Aa1$^+$ sérum anti IgM Aa1$^+$ par les fragments d'IgG et d'IgM.

Le test d'inhibition est effectué dans le système précipitant suivant:
immunsérum: 0,2ml du sérum de la saignée VII du lapin n^{0}003 anti IgM Aa1$^+$,
antigène: 0,2ml d'une solution d'IgM à 0,125 mg/ml du lapin trypanosomé n^{0}883,
quantité totale de précipité: 31 μg.

Les inhibiteurs examinés sont:
IgMs(○): IgMs obtenue à partir des IgM du lapin trypanosomé n^{0}883,
Fab-μ-pap(●): Fab-μ-pap obtenu à partir des IgM du lapin trypanosomé n^{0}911,
Fab-μ-try(x): Fab-μ-try obtenu à partir des IgM du lapin trypanosomé n^{0}911,
Fab-γ-pap(*): Fab-γ-pap obtenu à partir des IgG du lapin normal n^{0}883.
0,1ml d'une solution d'inhibiteur est ajoutée dans le système précipitant aux diverses concentrations indiquées sur la figure.

Etant donné que l'immunsérum n^{0}003 a été préparé par injection d'IgM, on pourrait s'attendre que les anticorps produits s'adaptent mieux aux déterminants allotypiques des IgM qu'à ceux des IgG, et que l'inhibition de la précipitation par les fragments d'IgM soit plus forte que l'inhibition par les fragments d'IgG. C'est ce qui a été observé, en effet, pour Fab-μ-pap et Fab-γ-pap. Mais, quoique les fragments Fab-μ-try aient la même origine que les

TABLEAU 4

Inhibition, par les fragments d'IgG et d'IgM Aa1$^+$ et Aa3$^+$, de la précipitation des protéines intactes avec les sérums anti allotypiques correspondants.

Systèmes précipitants		Inhibiteurs				
		Fragments d'IgM			Fragments d'IgG	
		IgMs	Fab-μ-try	Fab-μ-pap	Fab-γ-try	Fab-γ-pap
IgM Aa1$^+$ sérum n^{0}003 anti IgM Aa1$^+$ (Figure 5)	Inhibition maximum	100%	75%	100%		85%
	Concentration nécessaire pour 50% d'inhibition	0,53μM	1,68μM	0,90μM		1,10μM
IgG Aa1$^+$ sérum n^{0}335 anti précipité spécifique Aa1$^+$ (Figure 6)	Inhibition maximum	45%			100%	100%
	Concentration nécessaire pour 50% d'inhibition	>5,6μM			2μM	2μM
IgG Aa3$^+$ sérum n^{0}212 anti précipité spécifique Aa3$^+$ (Figure 7)	Inhibition maximum		85%			95%
	Concentration nécessaire pour 50% d'inhibition		5,5μM			6,8μM
Sérum total Aa3$^+$ sérum n^{0}212 anti précipité spécifique Aa3$^+$ (Figure 8)	Inhibition maximum	90%				
	Concentration nécessaire pour 50% d'inhibition	2,2μM				

fragments Fab-μ-pap, ils ne donnent qu'une inhibition incomplète et plus faible que l'inhibition obtenue avec les fragments Fab-γ-pap. Pour expliquer ceci, il faudrait supposer que la digestion trypsique des IgM a causé soit la perte de déterminants allotypiques, soit une modification structurale aux environs de ces déterminants, de telle manière que les anticorps s'adaptent moins bien avec eux. Ainsi l'inhibition obtenue ne pourrait être que partielle.

La figure 6 montre les résultats de l'inhibition de la précipitation du système IgG Aa1$^+$ sérum n^{0}335 anti précipité spécifique Aa1$^+$ par des préparations de Fab-γ-try, Fab-γ-pap et IgMs. Avec de fortes concentrations de Fab-γ-pap ou Fab-γ-try on parvient à une inhibition presque complète. On obtient 50% d'inhibition avec une concentration de 2μM de l'un ou l'autre de ces fragments (tableau 4). Le pouvoir inhibiteur d'IgMs est nettement inférieur à celui des fragments Fab puisqu'à la concentration de 2μM IgMs n'inhibe que 30% de la précipitation et sa courbe d'inhibition forme un plateau sans atteindre 50% d'inhibition (tableau 4).

Dans les deux systèmes précipitants susmentionnés, on pourrait remarquer la correspondance entre les inhibitions incomplètes et les résultats qui manifestent une précipitation incomplète dans les réactions en milieu gélifié et décrites dans les chapitres précédents (planche 1 B, planche 2 B et planche 4 A et B): dans le système IgM Aa1$^+$ sérum n^{0}003 anti IgM Aa1$^+$, on n'observe qu'une inhibition incomplète (de 85%) avec Fab-γ-pap qui conserve pourtant la propriété d'inhiber à 100% la précipitation des IgG Aa1$^+$ par le sérum n^{0}335 anti précipité spécifique Aa1$^+$; dans le système IgG Aa1$^+$ sérum n^{0}335 anti précipité spécifique Aa1$^+$, on n'observe qu'une inhibition incomplète (de 45%) avec IgMs qui inhibe pourtant à 100% la précipitation des IgM Aa1$^+$ par le sérum n^{0}003 anti IgM Aa1$^+$ (tableau 4).

Il semble donc que les sous-unités et fragments, IgMs et Fab-μ-pap d'une part, Fab-γ-pap et Fab-γ-try d'autre part, conservent tous les déterminants allotypiques (propres et communs) que possèdent les molécules entières d'IgM ou d'IgG à partir desquelles ils ont été préparés.

On peut être tenté d'expliquer qu'il existe des déterminants allotypiques propres aux IgG en supposant que ces déterminants sont masqués sur la molécule d'IgM dont la structure est plus complexe. Nos résultats suggèrent que, si ce masquage existe, il n'est pas dû à l'assemblage des sous-unités d'IgM en une grosse molécule mais qu'il est déjà réalisé dans la sous-unité de 4 chaînes polypeptidiques dont la structure, malgré le nombre égal de chaînes peptidiques lourdes et légères, est quelque peu différente de celle des IgG en raison des différences non seulement de constitution mais de longueur des chaînes lourdes.

b) Sur la non-précipitabilité des sous-unités et des fragments d'IgG et d'IgM avec les sérums anti allotypiques.

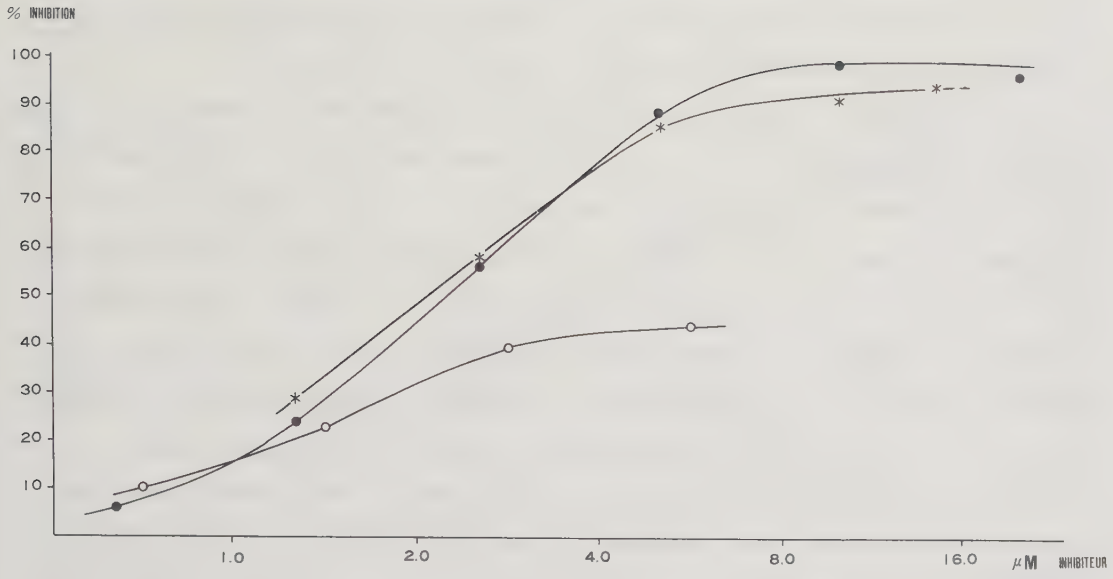


Figure 6. Inhibition de la précipitation du système IgG Aa1$^+$ sérum anti précipité spécifique Aa1$^+$ par les fragments d'IgG et d'IgM.

Le test d'inhibition est effectué dans le système précipitant suivant: immunsérum: 0,1 ml du sérum n^{0}335 anti précipité spécifique Aa1$^+$, dilué au demi dans l'eau salée à 0,9%, antigène: 0,1ml d'une solution d'IgG à 1mg/ml du lapin normal n^{0}883, quantité totale de précipité: 27 μg.

Les inhibiteurs examinés sont:
IgMs(○): IgMs obtenue à partir des IgM du lapin trypanosomé n^{0}883,
Fab-γ-pap(●): Fab-γ-pap obtenu à partir des IgG du lapin normal n^{0}883,
Fab-γ-try(∗): Fab-γ-try obtenu à partir des IgG du lapin trypanosomé n^{0}883.
0,1 ml d'une solution d'inhibiteur est ajoutée dans le système précipitant aux diverses concentrations indiquées sur la figure.

D'après les résultats résumés sur le tableau 3, on pourrait se demander pourquoi les sous-unités d'IgMs ne précipitent pas avec les sérums anti allotypiques de la série a correspondants (préparés par des injections de précipité spécifique) ni avec le sérum anti IgM Aa1$^+$, quoique leur structure ressemble à celle des IgG, qui les précipitent. On pourrait aussi se demander pourquoi les fragments Fab-μ-try d'allotype Aa2 et Aa3 ne précipitent pas avec les sérums anti allotypiques correspondants, alors que les fragments Fab-γ-pap des mêmes allotypes les précipitent. Il se pourrait que le nombre des déterminants allo-

typiques portés par les sous-unités IgMs (ou les fragments Fab-μ-try) soit plus petit que le nombre de ceux portés par les IgG (ou les fragments Fab-γ-pap), et qu'il ne soit pas suffisant pour faire apparaître la précipitation.

Les fragments Fab-γ-pap $Aa3^+$ sont précipitables par le sérum n°212 anti précipité spécifique $Aa3^+$, mais cette précipitation est faible et elle n'apparaît pas lorsque les fragments sont en excès même faible. On a comparé le pouvoir inhibiteur des fragments Fab-γ-pap et Fab-μ-try dans le système précipitant IgG $Aa3^+$ sérum n°212 anti précipité spécifique $Aa3^+$. La figure 7 et le tableau 4 montrent ces résultats. La précipitation est inhibée à 95% par Fab-γ-pap et à 85% par Fab-μ-try. Les concentrations nécessaires pour obtenir 50% d'inhibition sont 6,8 μM et 5,5 μM respectivement, soit peu de différence entre les deux. Si l'on tentait de faire une comparaison du nombre des déterminants contenus dans les préparations de ces deux fragments d'après leur pouvoir inhibiteur, on pourrait constater que du point de vue de la concentration moléculaire de ces préparations les pouvoirs inhibiteurs sont suffisamment voisins pour suggérer que la différence dans le nombre des déterminants portés par les fragments est faible.

La figure 8 et le tableau 4 montrent les résultats de l'inhibition obtenue avec une préparation d'IgMs $Aa3^+$ dans le système précipitant: sérum total du lapin n°827 $Aa3^+$ sérum n°212 anti précipité spécifique $Aa3^+$. La sous-unité IgMs inhibe la précipitation à 90%, ce qui semble indiquer qu'elle conserve la plupart des déterminants allotypiques de la protéine intacte quoiqu'elle ne précipite pas le sérum anti allotypique. Puisque le fragment Fab-μ-try qui ne précipite pas non plus le sérum anti allotypique devrait théoriquement posséder autant de déterminants allotypiques que le fragment Fab-γ-pap qui le précipite faiblement, et puisqu'il est généralement admis qu'une molécule d'IgMs contient 2 fragments Fab-μ-try, il devient difficile d'attribuer la non-précipitabilité d'IgMs au nombre insuffisant des déterminants allotypiques qu'elle porte. Ce fait pourrait alors être expliqué en faisant intervenir des différences dans les structures tertiaire et quaternaire des IgMs, des IgG, de Fab-μ-try et de Fab-γ-pap, mais pour cela une meilleure connaissance de ces structures serait nécessaire.

VI) Les spécificités isotypiques et allotypiques des microimmunoglobulines.

Au cours du fractionnement des sérums trypanosomés sur Séphadex G200,

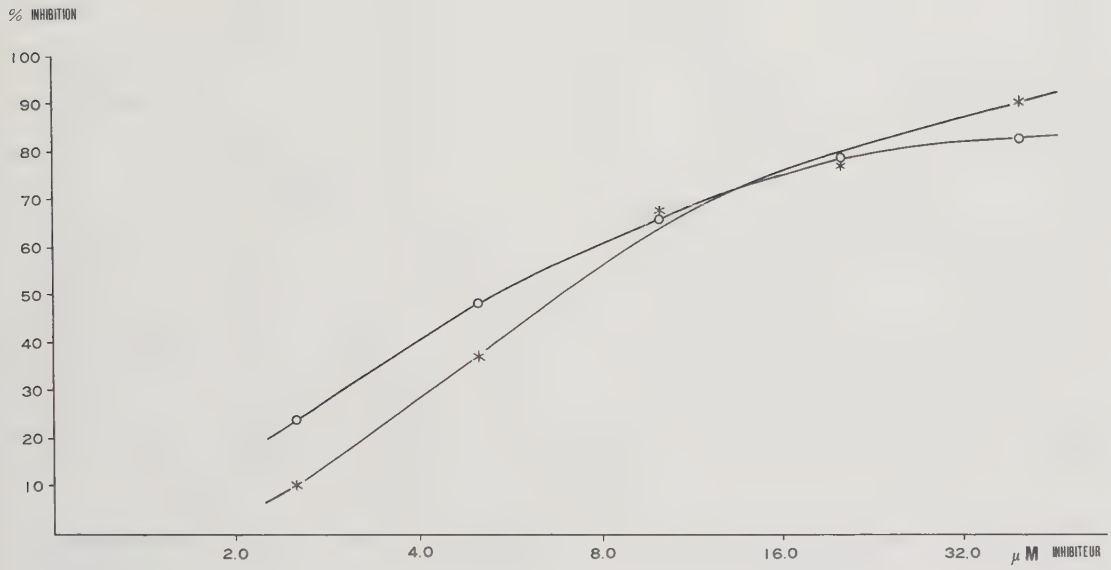


Figure 7. Inhibition de la précipitation du système IgG $Aa3^+$ sérum anti précipité spécifique $Aa3^+$ par les fragments d'IgG et d'IgM.

Le test d'inhibition est effectué dans le système précipitant suivant: immunsérum: 0,1ml du sérum $n^0$212 anti précipité spécifique $Aa3^+$ dilué aux deux tiers dans l'eau salée à 0,9%, antigène: 0,lml d'une solution d'IgG à 0,32 mg/ml du lapin normal $n^0$904, quantité totale de précipité: 24,6 μg.

Les inhibiteurs examinés sont:
Fab-μ-try(○): Fab-μ-try obtenu à partir des IgM du lapin trypanosomé $n^0$880,
Fab-γ-pap(∗): Fab-γ-pap obtenu à partir des IgG du lapin normal $n^0$904.
0,1ml d'une solution d'inhibiteur est ajoutée dans le système précipitant aux diverses concentrations indiquées sur la figure.

nous avons trouvé que non seulement les fractions des 1er et 2ème pics mais aussi celles du 3ème pic contenaient des composants qui portaient des déterminants allotypiques et isotypiques des immunoglobulines. A cause de leur faible concentration et de quelques différences d'un sérum à l'autre, il était difficile de préciser la localisation de ces composants parmi les fractions effluentes, mais en général ils se trouvaient dans la dernière moitié du 3ème pic de Séphadex G200 et aux environs de la position effluente de l'ovalbumine de poule sur

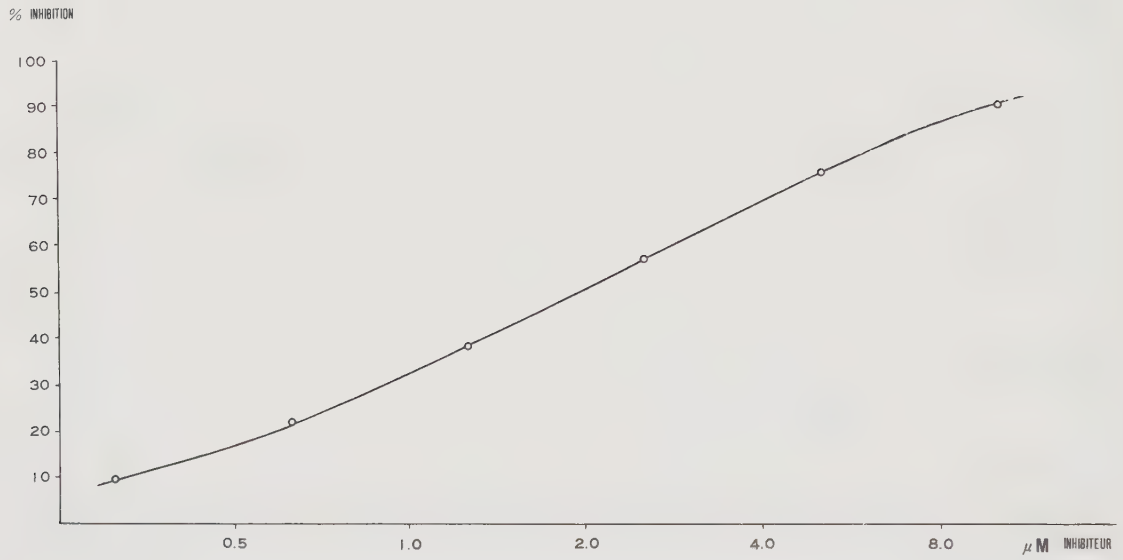


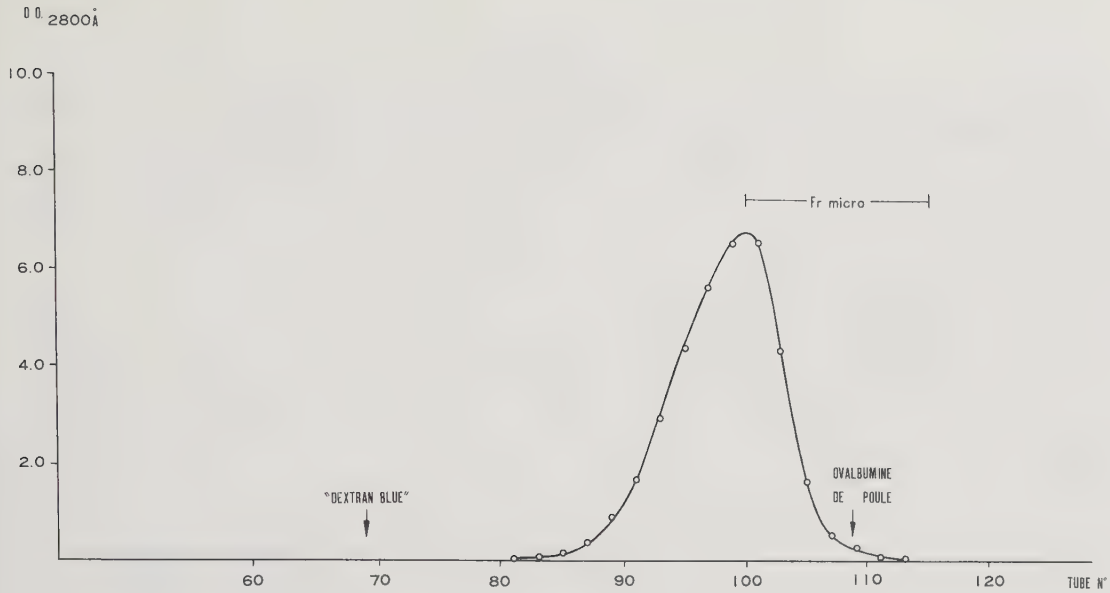
Figure 8. Inhibition de la précipitation du système sérum total $Aa3^+$ sérum anti précipité spécifique $Aa3^+$ par les IgMs.

Le test d'inhibition est effectué dans le système précipitant suivant:
immunsérum: 0,1ml du sérum n°212 anti précipité spécifique $Aa3^+$,
antigène: sérum du lapin normal n°827 dilué à 1/10 , quantité totale de précipité: 45μg.

L'inhibiteur examiné est IgMs obtenue à partir des IgM du lapin trypanosomé n°672. 0,1ml d'une solution d'inhibiteur est ajoutée dans le système précipitant aux diverses concentrations indiquées sur la figure.

Séphadex G100; leur poids moléculaire est donc d'environ 45.000 (figure 9).

Ces fractions d'immunoglobulines de faible poids moléculaire seront appelées microimmunoglobulines après BERGGÅRD et coll. (1967) et seront désignées par l'abréviation Fr micro. Elles ont été préparées à partir de divers sérums: 4 sérums de lapins trypanosomés, 1 sérum normal et un mélange de 3 sérums anti hématies de mouton. Leurs réactions de précipitation en milieu liquide à l'interface avec des immunsérums anti μ, anti γ et anti allotypes sont résumées sur le tableau 5. La Fr micro du lapin n°903 a été purifiée au moyen d'une électrophorèse préparative et on appellera la fraction de micro-immunoglobulines ainsi obtenues Ep micro (figure 10).



IS DE CHEVRE ANTI IgG	–	–	–	–	–	–	–	±	±	++	++	++	±	–	–
IS 216 ANTI A 2	–	–	–	–	–	–	–	±	+	+	+	+	+	–	–
IS 034 ANTI A 4	–	–	–	–	–	–	–	±	+	+	+	+	+	–	–

Figure 9. Filtration sur Séphadex G100 d'une fraction de microimmunoglobulines du lapin n°901

La dernière moitié des fractions du 3ème pic de Sphadex G200, obtenues à partir de 40ml du sérum trypanosomé n°901, a été repassée sur la même colonne de Séphadex G200 (diamètre de la colonne: 5cm; hauteur de la colonne: 86cm). La dernière moitié des fractions est recueillie et passée sur une colonne de Séphadex G100 (diamètre de la colonne: 2,5cm; hauteur 93cm; vitesse de l'élution: 10ml/heure; volume d'une fraction: 2ml/tube). C'est la courbe de densité optique de ce dernier fractionnement qui est représentée sur la figure. Les positions d'élution du "dextran blue" et de l'ovalbumine de poule sont indiquées par des flèches. Les résultats des réactions de précipitation en milieu liquide à l'interface avec un sérum de chèvre anti IgG de lapin, le sérum n°216 anti Aa2 et le sérum n°034 anti Ab4 sont présentés au-dessous du graphique. Les signes ++, +, ±, et – indiquent respectivement une réaction fortement positive, une réaction positive, une réaction faiblement positive et une réaction négative. Les fractions désignées sur la courbe par le symbole Fr micro ont été recueillies, concentrées jusqu'à environ 2ml et utilisées comme une fraction de microimmunoglobulines dans les expériences.

Les microimmunoglobulines du lapin n°903 ont été les plus analysées et ce sera sur elles que portera la description générale.

a) Les spécificités isotypiques des microimmunoglobulines.

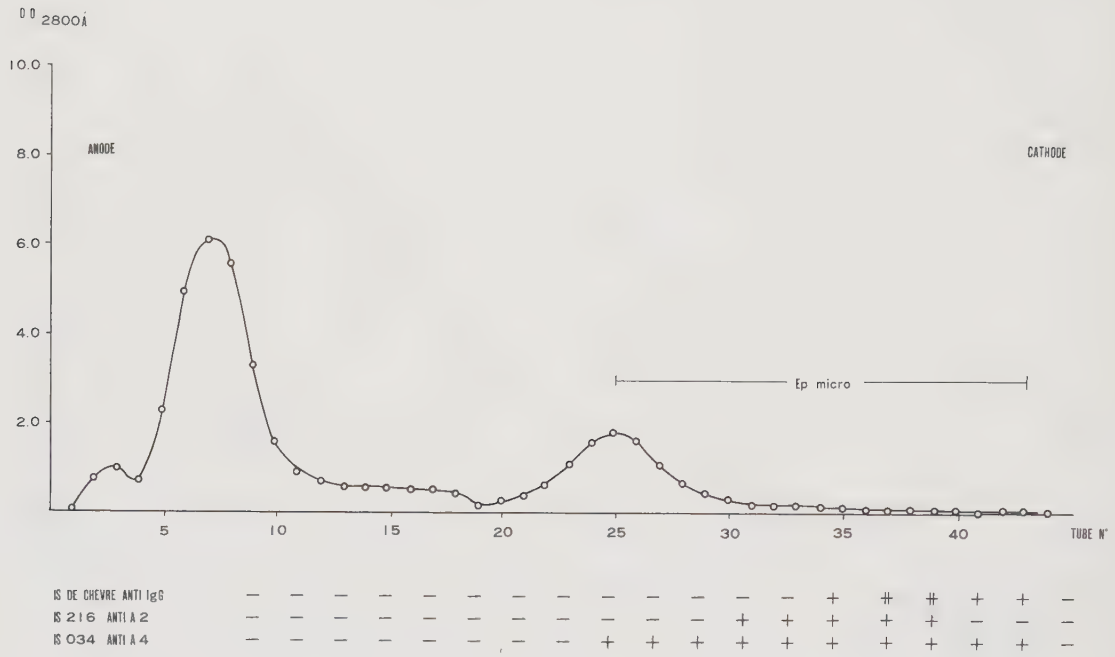


Figure 10. Electrophorèse préparative d'une fraction de microimmunoglobulines du lapin n°903

Une fraction contenant des microimmunoglobulines (Fr micro) obtenue par la filtration sur gel de Séphadex du sérum trypanosomé n°903, est soumise à une électrophorèse préparative sur colonne (diamètre de la colonne: 3cm; hauteur de la colonne: 40cm) équilibrée avec du tampon alcalin au glycocolle de pH 8,8. L'élution est faite à une vitesse de 24ml/heure, le volume des fractions recueillies est 2ml. Les résultats des réactions de précipitation en milieu liquide à l'interface avec un sérum de chèvre anti IgG de lapin, le sérum n°216 anti Aa2 et le sérum n°034 anti Ab4 sont montrés au-dessous du graphique. Les signes ++, +, ± et – indiquent respectivement une réaction fortement positive, une réaction positive, une réaction faiblement positive et une réaction négative. Les fractions désignées comme Ep micro sont recueillies et utilisées dans les expériences.

Les réactions du tableau 5 (immunsérums anti μ et anti γ) montrent que la fraction de microimmunoglobulines du sérum du lapin n°903 contient des composants possédant les spécificités isotypiques des chaînes μ et γ; les réactions en milieu gélifié de la même fraction avec les sérums anti IgM et anti IgG sont représentées sur les figures A et B de la planche 6. Les immunsérums contre les IgG n'ont pas été épuisés par les IgM ni les immunsérums contre les IgM

TABLEAU 5

Réaction de précipitation à l'interface en milieu liquide des microimmunoglobulines avec un sérum de poule anti μ, un sérum de mouton anti γ et des sérums de lapins anti allotypes

	Sérums trypanosomés				Sérum normal	Mélange de 3 sérums anti hématies de mouton		
n° des lapins	883	901	880	903	901	884	885	904
Phénotype	Aa1b4	Aa2b4	Aa3b4	Aa1a2b4	Aa2b4	Aa1a2b4	Aa1a2b4	Aa3b4
Immunsérums précipitants								
anti μ	+	+	+	+	+	+		
anti γ	+	±	+	+	±	+		
anti Aa1 (n°335)	–	...	...	-	...	-		
anti Aa2 (n°216)	...	+	...	+	+	+		
anti Aa3 (n°212)	...	...	–	...	...	+		
anti Ab4 (n°034)	+	+	+	+	+	+		

Les signes +, ± et – indiquent respectivement une réaction positive, une réaction faible et une réaction négative. Le signe ... indique que la réaction n'a pas été étudiée.
Les fractions des microimmunoglobulines utilisées ont été concentrées 15 fois par rapport au volume initial de sérum.

par les IgG; ces immunsérums ne sont donc pas exclusivement spécifiques des chaînes lourdes.

– la spécificité isotypique des IgG portée par les microimmunoglobulines.

Sur la figure B de la planche 6 où est représentée une réaction avec l'immunsérum de mouton anti IgG, on observe deux zones de précipitation en face de la couche de Fr micro, dont l'une est tout à fait continue avec la zone observée en face de Fc, et l'autre avec la zone observée en face de Fab-γ-pap. Cette réaction montre qu'il existe dans la Fr micro un antigène qui possède la spécificité isotypique du fragment de digestion Fab-γ-pap telle que l'immunsérum de mouton anti IgG est capable de la déceler, et qui ne possède pas la spécificité isotypique du fragment Fc: cet antigène se manifeste par la zone de précipitation la plus éloignée de la couche de Fr micro. La même réaction montre aussi que l'antigène qui est responsable de la zone de précipitation la plus rapprochée de la couche de Fr micro possède la spécificité isotypique du

Planche 6

A et B. Comparaison des microimmunoglobulines avec les fragments des IgG et des IgM.

Réaction en milieu gélifié (diffusion double en cuves à faces parallèles) des microimmunoglobulines avec les immunsérums anti IgM et anti IgG.

Dans la cuve A,

couches supérieures: de gauche à droite

les chaînes μ des IgM du lapin n°892 (0,3mg/ml),

la fraction Fr micro du lapin n°903,

les fragments Fab-μ-try des IgM du lapin n°804 (0,1mg/ml),

les chaînes légères des IgM du lapin n°892 (0,15mg/ml)

couche moyenne: la gélose pure

couche inférieure: le sérum de poule anti IgM de lapin

Dans la cuve B,

couches supérieures: de gauche à droite

les fragments (Fc) préparés à partir du mélange des IgG des lapins n°884 et n°885 (0,05mg/ml),

la fraction Fr micro du lapin n°903,

les fragments Fab-γ-pap des IgG du lapin n°883 (0,1mg/ml),

les chaînes légères des IgM du lapin n°892 (0,25mg/ml)

couche moyenne: la gélose pure

couche inférieure: le sérum de mouton anti IgG de lapin

C, D et E. Comparaison des fractions de microimmunoglobulines avec les fragments Fab-γ-pap

Réaction en milieu gélifié (diffusion double en cuves à faces parallèles).

dans la cuve C

couches supérieures: de gauche à droite

les fragments Fab-γ-pap des IgG du lapin n°883 (2,5mg/ml)

la fraction contenant les IgG du lapin n°883 (le 2ème pic de Séphadex G200)

la fraction Fr micro du lapin n°883

couche moyenne: la gélose pure

couche inférieure: le sérum n°335 anti Aa1

dans la cuve D

couches supérieures: de gauche à droite

les fragments Fab-γ-pap préparés à partir du mélange des IgG des lapins n°884 et n°885 (0,5mg/ml),

la fraction contenant les IgG du lapin n°901,

la fraction Fr micro du lapin n°901

couche moyenne: la gélose pure

couche inférieure: le sérum n°216 anti Aa2

dans la cuve E

couches supérieures: de gauche à droite

les fragments Fab-γ-pap des IgG du lapin n°904 (0,5mg/ml),

la fraction contenant les IgG du lapin n°880,

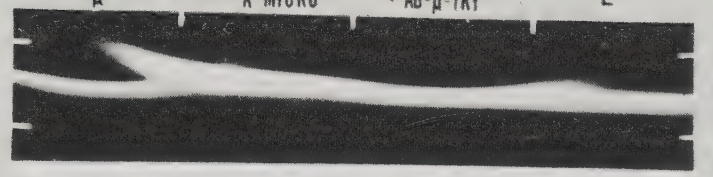
la fraction Fr micro du lapin n°880

couche moyenne: la gélose pure

couche inférieure: le sérum n°212 anti Aa3

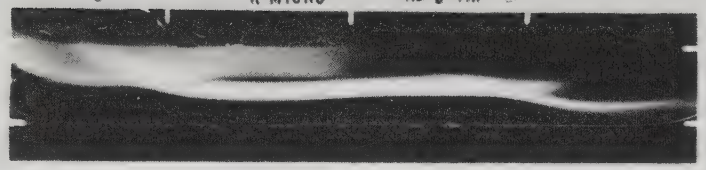
Planche 6

A



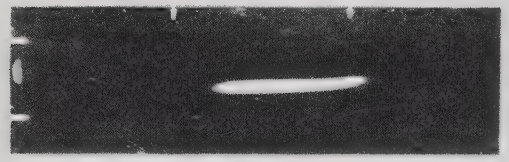
ANTI-IgM

B



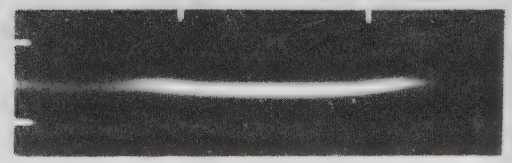
ANTI-IgG

C



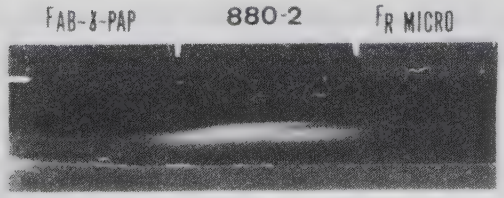
335 ANTI A 1

D



216 ANTI A 2

E



212 ANTI A 3

fragment Fc; mais elle ne permet pas de savoir si ce dernier antigène possède en outre la spécificité isotypique du fragment Fab ou s'il ne la possède pas. Cette réaction n'exclut donc pas la possibilité que l'antigène responsable de la deuxième zone de précipitation, qui semble avoir un poids moléculaire de l'ordre de 45.000, possède la spécificité antigénique à la fois des fragments Fab et des fragments Fc. D'autre part, la zone de précipitation observée en face de la couche Fab-γ-pap se bifurque en regard de l'interface entre cette couche et la couche de chaînes légères. Les anticorps qui précipitent dans la branche courte de cette bifurcation sont dirigés contre des déterminants antigéniques qui font partie de Fab et non des chaînes légères c'est-à-dire vraisemblablement contre des déterminants portés par le fragment Fd. Autrement dit, cet immunsérum contient des anticorps précipitants contre les fragments Fc et Fd de chaîne lourde γ, et contre les chaînes légères; et ces anticorps contre les différentes portions de la molécule d'IgG réagissent tous avec des antigènes contenus dans la fraction Fr micro.

– La spécificité isotypique des IgM portée par les microimmunoglobulines.

Sur la figure A de la planche 6, où est représentée une réaction avec l'immunsérum de poule anti IgM, on observe, en face de la couche de la Fr micro, une zone qui semble se continuer complètement avec une zone située en face de la couche de Fab-μ-try. Cela signifie que tous les déterminants de Fab-μ-try décelables avec cet immunsérum sont contenus dans la Fr micro. Cette zone de précipitation se bifurque en regard de l'interface de deux couches d'antigènes, Fab-μ-try et chaînes légères, en donnant une branche courte vers la couche des chaînes légères. En tenant le même raisonnement que celui que nous venons de faire au sujet de la réaction du sérum anti IgG, cet immunsérum anti IgM contient vraisemblablement des anticorps contre le fragment Fd de la chaîne μ ainsi que contre les chaînes légères. Mais la zone située en face de la Fr micro semble se croiser avec une zone donnée par les chaînes μ et il est difficile de distinguer s'il se produit une continuité partielle comme on était en mesure de l'espérer d'après les résultats du tableau 5; la Fr micro donne une réaction positive en ring test avec l'immunsérum anti μ (obtenu par épuisement de l'immunsérum anti IgM par les IgG); elle contient donc au moins un composant qui possède des déterminants antigéniques des chaînes μ. Ces détermi-

nants sembleraient être ceux situés sur le fragment Fd de chaîne μ, compte tenu de la continuité totale de la zone donnée par Fab-μ-try et Fr micro. La Fr micro semble donc contenir des déterminants du fragment Fd de la chaîne μ et des chaînes légères.

– Analyses immunoélectrophorétiques

Désirant avoir une meilleure résolution des constituants, nous avons soumis la fraction de microimmunoglobulines purifiées par électrophorèse préparative à partir de Fr micro (Ep micro) à une analyse immunoélectrophorétique. Comme le montre la figure A de la planche 7, la fraction Ep micro donne avec le sérum anti IgG, deux zones dont la mobilité électrophorétique est différente (réaction 2-II); la zone décelée dans la région β–γ est beaucoup plus faible que l'autre et difficilement visible. Avec le sérum anti IgM, la même fraction donne deux zones très voisines de même mobilité (réaction 2-III). Sur cette figure, on pourrait faire aussi la comparaison de la fraction Ep micro n^{0}903 (trou 2) avec une autre fraction de microimmunoglobulines (Fr micro n^{0}883: trou 3), avec Fab-γ-pap (trou 4), et avec Fab-μ-try (trou 5), au point de vue de la réactivité de ces fractions avec des immunsérums: anti IgG (gouttière II) et anti IgM (gouttière III); Fab-μ-try (trou 5) migre dans la région β et donne une forte réaction avec le sérum anti IgM (gouttière III) et une réaction très faible (même position) qu'on voit à peine sur la photographie avec le sérum anti IgG (gouttière II), tandis que Fab-γ-pap (trou 4) migre dans la région β–γ et donne une réaction d'intensité semblable avec les deux immunsérums (gouttières II: anti IgG, et III: anti IgM). Quant à la fraction Fr micro n^{0}883 (trou 3) elle contient des constituants assez différents de ceux contenus dans la fraction Ep micro 903 (trou 2); elle ne donne qu'un seul arc de précipitation dans la région β–γ avec chaque immunsérum et l'intensité de sa réaction avec le sérum anti IgM est beaucoup plus forte que celle avec le sérum anti IgG. Ainsi les constituants des fractions de microimmunoglobulines qui sont hétérogènes chez un même individu peuvent encore être différents d'un individu à l'autre.

b) Les spécificités allotypiques des microimmunoglobulines.

– Mise en évidence

Les réactions de précipitation à l'interface des immunsérums contre les spécificités allotypiques de la série a avec 5 fractions de microimmunoglobulines

Planche 7

Analyse immunoélectrophorétique en agarose des fractions de microimmunoglobulines et comparaison de leur mobilité avec celle des fragments enzymatiques des IgG et des IgM.

Plaque A, on trouve dans les trous

1: le sérum total d'un lapin trypanosomé n°804

2: la fraction d'électrophorèse préparative des microimmunoglobulines (Ep micro) du lapin n°903

3: la fraction des microimmunoglobulines (Fr micro) du lapin n°883

4: les fragments Fab-γ-pap des IgG du lapin n°883 (1mg/ml)

5: les fragments Fab-μ-try des IgM du lapin n°883 (0,6mg/ml)

dans les gouttières

I: le sérum de brebis anti sérum total de lapin

II: le sérum de chèvre anti IgG de lapin

III: le sérum de poule anti IgM de lapin

Plauqe B, la migration électrophorétique des microimmunoglobulines est révélée par le sérum anti Ab4

On trouve dans les trous:

1: le sérum total du lapin trypanosomé n°903

2,3,4; la fraction d'électrophorèse préparative des microimmunoglobulines (Ep micro) du lapin n°903

dans les gouttières

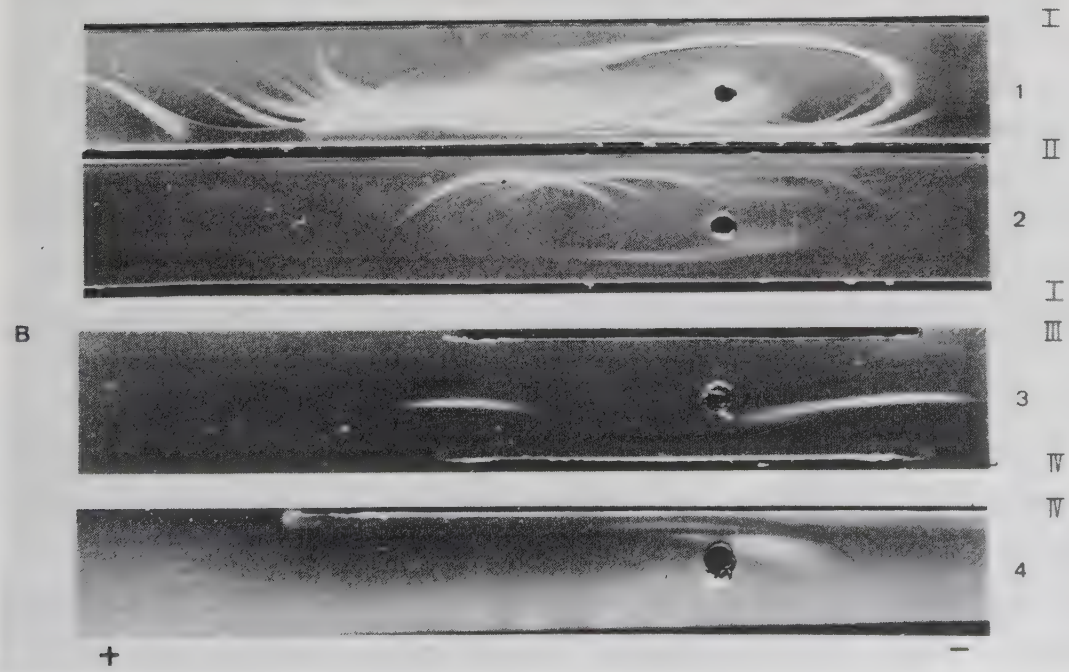
I: le sérum de mouton anti IgG de lapin

II: le sérum de brebis anti sérum total de lapin

III: le sérum total du lapin n°804 (phénotype Aa2b4)

IV: le sérum n°034 anti Ab4

Planche 7



(4 préparées à partir de sérums trypanosomés et 1 à partir d'un sérum prélevé avant toute immunisation) n'ont permis de déceler que la spécificité Aa2, alors que la spécificité Ab4 a été décelée dans les 5 fractions (tableau 5). Nous avons cherché à savoir, au moyen de l'inhibition de la précipitation, si les fractions préparées à partir des sérums $Aa1^+$ ou $Aa3^+$ contenaient, elles aussi, des déterminants allotypiques correspondants. Les systèmes précipitants étaient les mêmes que ceux que nous avions utilisés pour analyser les déterminants allotypiques portés par les fragments des IgG et des IgM: pour Aa1, IgM $Aa1^+$ sérum n°003 anti IgM $Aa1^+$ et IgG $Aa1^+$ sérum n°335 anti précipité spécifique $Aa1^+$; pour Aa3, IgG $Aa3^+$ sérum n°212 anti précipité spécifique $Aa3^+$. Les résultats sont montrés sur la figure 11.

La Fr micro du sérum du lapin n°883 inhibe à 95-100% la précipitation des deux systèmes où intervient la spécificité Aa1 (figure 11 B et C); cette fraction semble donc contenir pratiquement tous les déterminants allotypiques de Aa1. Au contraire, la Fr micro du sérum du lapin n°880 n'inhibe la précipitation du sérum anti Aa3 qu'aux environs de 65%* (figure 11 A).

– Réaction en milieu gélifié des microimmunoglobulines avec les sérums anti allotypiques de la série a.

L'inhibition de la précipitation en milieu liquide aide à comprendre les réactions en milieu gélifié qui sont représentées sur les photographies C, D et E de la planche 6. Nous avons mis une couche de Fab-γ-pap dans les mêmes cuves que la Fr micro afin de comparer leurs réactions avec trois sérums anti allotypiques.

---

* En prenant comme référence les courbes d'inhibition obtenues avec Fab-γ-pap dans les systèmes IgG $Aa1^+$ sérum anti précipité spécifique $Aa1^+$ (figure 6) et IgG $Aa3^+$ sérum anti précipité spécifique $Aa3^+$ (figure 7) on peut tenter d'obtenir une approximation de la concentration de ce que l'on pourrait considérer comme l'équivalent de Fab-γ-pap dans Fr micro des sérums trypanosomés n°883 et n°880 respectivement. En se basant sur la quantité d'inhibition nécessaire pour atteindre 50% d'inhibition et en considérant que ces Fr micro ont été concentrées 15 fois on trouve que la Fr micro à sa concentration normale dans les sérums n°880 et 883 contient respectivement 46 μg et 32 μg par ml de ce que l'on p considérer comme l'équivalent de Fab-γ-pap.

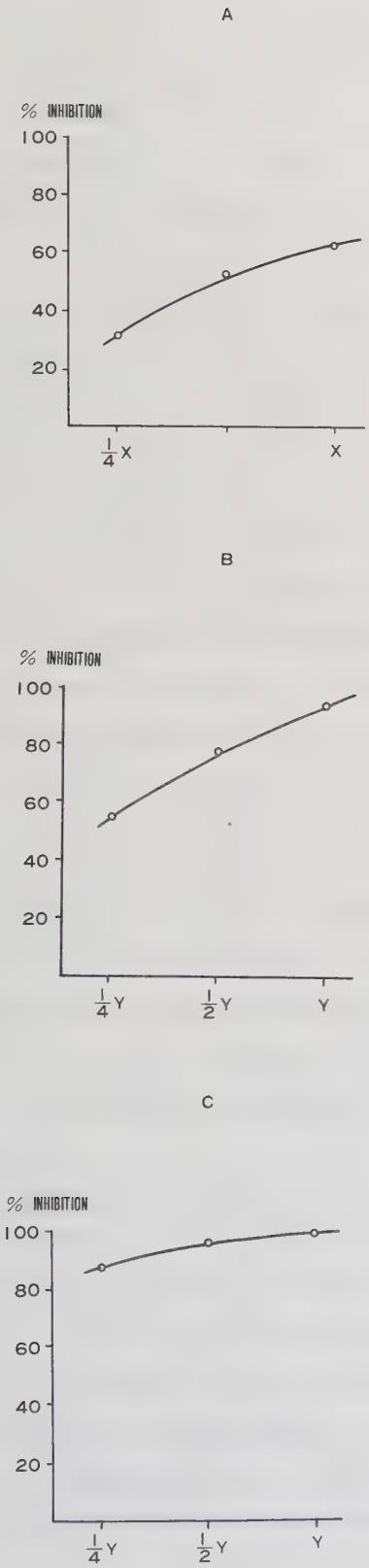


Figure 11. Inhibition par des fractions de microimmunoglobulines de la précipitation dans les systèmes suivants:

(A) IgG $Aa3^+$ sérum anti précipité spécifique $Aa3^+$

(B) IgG $Aa1^+$ sérum anti précipité spécifique $Aa1^+$

(C) IgM $Aa1^+$ sérum anti IgM $Aa1^+$.

Pour (A) l'inhibition est réalisée avec la Fr micro du lapin n°880 (X); pour (B) et (C) l'inhibition est réalisée avec la Fr micro du lapin n°883 (Y). Les solutions de Fr micro des sérums 880 et 883 (respectivement X et Y) sont concentrées 15 fois et les systèmes d'inhibition sont les mêmes que ceux rapportés pour les figures 5, 6 et 7. 53% d'inhibition donnée par 1/2 X sur le graphique (A) correspond à une inhibition donnée par une solution de Fab-γ-pap à 7 μM (0,35mg/ml) (figure 7). 55% d'inhibition donnée par 1/4 Y sur le graphique (B) correspond à une inhibition donnée par une solution de Fab-γ-pap à 2,4 μM (0,12 mg/ml) (figure 6). En profitant de ce rapport, on a calculé (voir texte) la concentration approximative des microimmunoglobulines qui portent les déterminants allotypiques.

Sur la figure D, où sont montrées les réactions avec le sérum n°216 anti Aa2, on observe une zone qui se continue en face de toutes les couches d'antigènes, quoiqu'il y ait des différences dans l'intensité de la réaction; la zone située en face de la couche de Fab-γ-pap est faible en comparaison de celle donnée par les IgG et celle située en face de la couche de la Fr micro est encore plus faible.

Dans la réaction avec le sérum anti Aa1 (figure C), on observe une zone de précipitation en face de la couche d'IgG. Cette zone est brusquement interrompue en regard de l'interface entre la couche d'IgG et la couche de la Fr micro et en regard de l'interface entre la couche d'IgG et celle de Fab-γ-pap, ce qui suggère une combinaison antigène anticorps sans précipitation, en accord avec le résultat du test d'inhibition qui a montré que l'on pouvait obtenir une inhibition de 95 à 100% avec ces antigènes.

Dans la réaction avec le sérum anti Aa3 (figure E), la situation est un peu plus compliquée, car la réaction du sérum n°212 se manifeste par deux zones dûes aux deux variantes du motif Aa3, portées par des molécules différentes. Deux zones situées en face de la couche d'IgG sont plus près l'une de l'autre en regard de l'interface de deux couches d'antigènes, Fab-γ-pap et IgG, et en face de la couche de Fab-γ-pap, on n'en distingue plus qu'une, de densité faible; de l'autre côté ces deux zones s'effacent en regard de l'interface entre la couche d'IgG et la couche de la Fr micro. Il semblerait qu'il y ait là aussi une combinaison antigène anticorps sans précipitation, ce qui est en accord avec l'inhibition de la précipitation avec IgG par la Fr micro.

– Sur la non-précipitabilité des microimmunoglobulines avec les sérums anti allotypiques de la série a.

Comme nous avons montré plus haut, les fractions de microimmunoglobulines de phénotype Aa1 ou Aa3 ne précipitent pas avec les immunsérums anti allotypiques appropriés. Nous avions vu précédemment que les fragments Fab-μ-try ne précipitent pas non plus. Etant donné que les Fr micro contiennent des déterminants isotypiques des chaînes γ et des chaînes μ, on pourrait supposer que les déterminants allotypiques contenus dans la Fr micro aient leur origine dans les chaînes γ et les chaînes μ. Ainsi pourrait-on chercher à expliquer que les fractions de microimmunoglobulines ne précipitent

pas les sérums anti Aa1 et anti Aa3 en supposant que la fraction de microimmunoglobulines est un mélange de deux sortes de fragments qui ressemblent aux fragments Fab-γ-pap et Fab-μ-try obtenus par la digestion enzymatique des IgG et des IgM: Fab-μ-try Aa3$^+$ qui ne précipite pas lui-même inhibe la précipitation de Fab-γ-pap Aa3$^+$ avec le sérum anti Aa3; quant à Aa1, puisque ni Fab-γ-pap ni Fab-μ-try ne précipitent, le mélange de deux ne précipite pas.

Cette supposition deviendrait plus probable si l'on remarque que l'aptitude ou l'inaptitude d'un mélange de Fab-γ-pap Aa3$^+$ et de Fab-μ-try Aa3$^+$ à précipiter avec un sérum anti Aa3 dépend de leurs proportions: un mélange de Fab-γ-pap Aa3$^+$ et Fab-μ-try Aa3$^+$ dans la proportion 1/3 ne précipite pas, mais un mélange de Fab-γ-pap et Fab-μ-try Aa3$^+$ 1/1 précipite. Ceci pourrait expliquer que la Fr micro préparée à partir d'un sérum anti hématies de mouton dont les IgM ne sont sans doute pas augmentées précipite le sérum anti Aa3 (tableau 5), alors que la Fr micro préparée à partir d'un sérum trypanosomé (IgM très augmentées) ne le précipite pas (tableau 5).

– Les motifs allotypiques Ab4 dans la fraction de microimmunoglobulines.

Au cours de la purification de la Fr micro du lapin n°903 par une électrophorèse préparative, nous avons observé que les spécificités allotypiques Aa2, Ab4 et la spécificité isotypique des IgG ne se trouvaient pas nécessairement ensemble au sein de la fraction Ep micro (figure 10). Les fractions qui sont précipitables par le sérum anti Ab4 comprennent toutes celles qui sont précipitables par les deux autres immunsérums et d'autres qui ne les précipitent pas; les fractions où Aa2 est décelée se situent vers le milieu et celles où est décelée la spécificité isotypique des IgG plus vers la cathode.

Une analyse immunoélectrophorétique a permis de révéler que les molécules de Ep micro qui portent les motifs allotypiques de Ab4 donnent deux arcs de précipitation qui ont une mobilité légèrement différente (planche 7B, réaction 4-IV). De plus, ces deux composants ont une autre propriété qui les distingue l'une de l'autre et qui se manifeste lorsqu'on essaye une inhibition de la précipitation du sérum d'un lapin Ab4$^+$ (planche 7B, gouttière III) avec le sérum anti Ab4 (gouttière IV) par la Ep micro qui est préalablement déplacée électrophorétiquement à partir du trou 3, la région de l'inhibition correspond à la zone de celui des deux constituants ci-dessus qui est

le plus mobile; on n'observe pas d'inhibition, mais plutôt une précipitation dans la région de mobilité de l'autre constituant.

Il est étrange que l'arc de précipitation révélant le constituant le plus mobile de Ep micro (planche 7 B, réaction 4-IV) ne s'observe pas au cours de l'essai d'inhibition illustré planche 7B, réaction 3-III et -IV. On peut remarquer que cet arc de précipitation est situé très près de la gouttière renfermant le sérum anti Ab4 comme si les possibilités de diffusion de ce constituant étaient supérieures à celles du constituant le moins mobile qui reste approximativement dans l'alignement du point d'application de l'échantillon. Un excès d'antigène entraînera donc beaucoup plus rapidement vers la gouttière le constituant dont la zone de précipitation en est la plus rapprochée. La zone d'inhibition observée planche 7 B, réaction 3-III et -IV pourrait être dûe au fait que le constituant le plus mobile a épuisé dans cette zone le sérum anti Ab4 tandis que l'absence de la zone de précipitation relative à ce constituant pourrait être expliquée par son déplacement vers la gouttière proche et sa rapide disparition dans celle-ci.

On sait que le sérum anti Ab4 reconnaît deux variantes de motifs allotypiques 4′ et 4″ portées par des molécules différentes, responsables des deux zones de précipitation qu'on observe dans les réactions en milieu gélifié, par exemple planche 2-A. On pourrait essayer d'interpréter les observations qui précèdent en supposant que les deux zones de précipitation observées après électrophorèse (planche 7 B, réaction 4-IV) correspondent aux micro-immunoglobulines qui portent les deux motifs 4′ et 4″. Il serait très intéressant que cette possibilité puisse être vérifiée car il ne semble pas avoir été observé jusqu'à présent de différences entre les propriétés physicochimiques des molécules qui portent deux variantes de motifs allotypiques de la série b ou de la série a.

DISCUSSION

I) Généralités

Chez les immunoglobulines de lapin, une trentaine de spécificités allotypiques sont connues: en plus des spécificités de la série a et de la série b qui ont été étudiées en détail (OUDIN 1960 II et III, DRAY et coll. 1962, DUBISKI et coll. 1967) et dont l'existence sur toutes les classes d'immunoglobulines est généralement admise (TODD 1963, FEINSTEIN 1963), plusieurs spécificités particulières soit aux IgM, soit aux IgG, soit aux IgA ont été décrites ou signalées (KELUS et coll. 1965; HAMERS et coll. 1965; SELL 1966; KELUS 1967; MANDY et coll. 1968; DUBISKI 1969; MASUDA et coll. 1969; CONWAY et coll. 1969 I et II). Les études de la transmission héréditaire de ces spécificités propres à une classe particulière d'immunoglobuline n'ont que rarement permis d'observer l'existence d'une liaison génétique avec les spécificités communes à toutes les classes. Ceci a cependant été décrit pour le motif A8 particulier aux IgG qui est trouvé seulement parmi les lapins $Aa1^+$ (HAMERS 1967), le motif Ms1 particulier aux IgM qui ne se rencontre que parmi les lapins $Aa3^+$ et le motif Ms3 propre aux IgM qui est trouvé parmi les lapins $Ab4^+$.

Au cours de l'étude dont les résultats sont rapportés dans les chapitres précédents nous avons principalement fait trois sortes d'observations:

– parmi les macroglobulines (vraisemblablement les IgM), il existe des molécules portant des spécificités apparemment propres aux IgM et différentes des spécificités de la série a,

– parmi les déterminants allotypiques Aa1 et Aa3 portés par les macroglobulines, il y a des déterminants qui ne se trouvent pas sur les IgG,

– parmi les déterminants allotypiques Aa1 et Aa3 qui sont sur les IgG, il y a des déterminants que l'on ne trouve pas sur les macroglobulines.

II) Sur les spécificités allotypiques propres qux IgM et différentes des spécificités de la série a.

Des spécificités allotypiques ont été considérées comme propres aux IgM parce qu'elles ont été décelées grâce à une zone de précipitation distincte

en milieu gélifié qu'on n'observait avec les immunsérums correspondants, qu'en face de la couche d'IgM. Cette réaction de précipitation persistait en milieu liquide à l'interface après épuisement des sérums anti allotypiques par les IgG correspondantes.

On a remarqué que cette zone de précipitation qui apparaissait en face de la couche d'IgM ne s'observait pas en face de la couche de sérum total, quoique l'allotype présumé propre aux IgM s'y trouve évidemment aussi; la raison de l'absence de cette zone était que l'allotype en question se trouve dans le sérum total à une concentration trop faible pour donner naissance à une zone de précipitation visible. Un raisonnement semblable conduit à la conclusion que l'absence de la zone de précipitation des mêmes allotypes en face de la couche d'IgG ne permet pas d'exclure la possibilité que des molécules portant les motifs allotypiques dont il s'agit ne se trouvent pas aussi dans la fraction d'IgG à une concentration faible, comme dans le sérum total. Le fait que les mêmes allotypes ont été cherchés dans le sérum au moyen de la réaction en milieu liquide des immunsérums épuisés par les IgG n'est sans doute pas non plus une preuve suffisante. En effet les fractions de macroglobulines dont la réaction en milieu gélifié donne une zone distincte ont été amenées à une concentration environ 20 fois plus forte que celles des mêmes protéines dans un sérum déjà beaucoup plus riche en IgM que le sérum normal. Pour qu'une expérience vraiment correcte puisse éliminier la possibilité que les allotypes dont il s'agit se trouvent dans les mêmes fractions que les IgG à une concentration comparable à celle qu'ils ont dans les macroglobulines, il aurait donc fallu concentrer les fractions qui contiennent les IgG de manière à amener leur volume à moins d'1/20 du volume du sérum, et sans doute à un volume beaucoup plus faible encore pour tenir compte de l'augmentation considérable de la concentration des IgM dans les trypanosomiases.

Ainsi n'est-il pas possible jusqu'à présent d'affirmer d'une manière parfaitement rigoureuse que les motifs allotypiques qui ont été mis en evidence dans les fractions de macroglobulines sont en fait propres aux IgM. Il est cependant possible de remarquer dès maintenant que ces allotypes représentent sans doute une proportion importante ou au moins appréciable des IgM, alors qu'à supposer qu'il existe parmi les IgG des molécules douées des mêmes

spécificités allotypiques, elles n'en représenteraient qu'une très petite minorité.

Cette discussion s'applique sans doute non seulement aux allotypes dont il est question dans cet exposé, mais aussi à ceux qui ont été signalés ou décrits par d'autres auteurs comme étant propres aux IgM.

On a cherché systématiquement ces allotypes dans un échantillon de sérums normaux au moyen de la réaction de précipitation en milieu liquide avec les immunsérums anti allotypiques correspondants préalablement épuisés par les IgG. Ces sérums anti allotypiques sont au nombre de trois mais deux d'entre eux reconnaissent probablement le même allotype. Le fait que, dans certains cas, comme cela s'est produit lors de la mise en évidence de ces allotypes, les sérums anti allotypiques ne précipitent pas le sérum total pourrait laisser subsister un léger doute puisqu'il n'est pas possible d'assurer que tout sérum présumé négatif l'est effectivement. Néanmoins il faut noter que les premiers sérums étudiés étaient en fait des mélanges de sérums dans lesquels la concentration des allotypes qui nous intéressent a pu être diminuée si tous les sérums mélangés ne les renfermaient pas et si le volume de ceux les contenant était beaucoup plus faible que celui des sérums ne les renfermant pas.

Les motifs allotypiques décelés par deux de ces immunsérums se rencontrent toujours chez des individus possédant par ailleurs le motif Aa2. Cette observation a renforcé la présomption étayée par divers autres résultats (épuisement, étude de la parenté antigénique en milieu gélifié) que ces deux immunsérums reconnaissent probablement le même allotype. Cette observation a donc montré qu'il existait très certainement une liaison entre les gènes qui régissent respectivement ce motif allotypique propre aux IgM et le motif Aa2. Des liaisons entre des allotypes d'IgM et des allotypes des locus a et b ont déjà été décrites. Par exemple il a été montré que le motif Ms1 se rencontrait toujours chez des individus $Aa3^+$ et que les individus $Ms3^+$ étaient toujours $Ab4^+$ (KELUS 1967). On peut aussi rapprocher cette observation de celle décrite par OUDIN en 1960 et qui est relative à une spécificité allotypique appelée "e" qu'on ne rencontrait que chez des individus $Aa2^+$ et contre laquelle il n'a pas été ensuite possible de renouveler l'immunsérum, de sorte qu'on ignore si le motif allotypique "e" était particulier aux IgM.

L'allotype décelé par le dernier immunsérum se rencontre chez des individus possédant par ailleurs indifféremment les spécificités des locus a et b. Aucune liaison systématique n'a pu être établie à son sujet.

Il n'a pas pu être déterminé si les allotypes propres aux IgM portaient ou non en même temps des spécificités de la série a. C'est néanmoins une question à laquelle il serait intéressant de pouvoir répondre.

III) Sur les différences légères entre les spécificités allotypiques de la série a selon qu'elles sont portées par les IgM ou les IgG.

L'étude des propriétés précipitantes en milieu gélifié d'immunsérums anti précipité spécifique $Aa1^+$ et $Aa3^+$ respectivement et d'un immunsérum anti IgM $Aa1^+$ avec des solutions d'IgM et d'IgG correspondantes a permis de mettre en évidence certains caractères des zones de précipitation qui manifestent des différences dans les spécificités Aa1 et Aa3 selon qu'elles sont portées par les molécules d'IgM ou d'IgG. Les choses se passent comme si certains déterminants antigéniques étaient communs aux deux classes d'immunoglobulines tandis que d'autres pourraient soit se trouver sur les IgG et manquer sur les IgM soit se trouver sur les IgM et manquer sur les IgG. Dans le chapitre où ces résultats sont décrits on a envisagé la possibilité d'une interprétation différente des images des zones de précipitation données par ces immunsérums. On ne pouvait en effet écarter définitivement l'hypothèse que les bifurcations des zones de précipitation qui paraissent traduire des différences dans les motifs de la série a ne soient dues à la superposition de deux zones qui, si l'on pouvait faire varier suffisamment la concentration des divers réactifs mis en présence, pourraient apparaître comme distinctes. Si cette interprétation était exacte elle ramènerait au cas de spécificités allotypiques propres à chacune des deux classes d'immunoglobulines et différentes des spécificités de la série a.

Les sérums anti Aa1 préalablement épuisés par des IgG lorsqu'ils permettaient de révéler des spécificités propres aux IgM et par des IgM lorsqu'ils distinguaient sur les IgG des spécificités qui leur étaient particulières ont permis la recherche, au sein d'une population de lapins, des spécificités Aa1 propres à chacune des deux classes. Il a ainsi pu être montré que ces spécificités étaient toujours accompagnées de la spécificité Aa1 chez les individus qui les possédaient. En fait elles ont été trouvées chez tous les individus $Aa1^+$ pour lesquels elles ont été cherchées et chez aucun individu $Aa1^-$ (102 individus

Aa1$^+$ et 31 individus Aa1$^-$ pour les spécificités particulières aux IgG; 6 individus Aa1$^+$ et 8 Aa1$^-$ pour les spécificités particulières aux IgM). L'existence de ces déterminants allotypiques semble donc inséparable de celle du motif Aa1 et vice versa. Ceci représente une différence essentielle avec les allotypes propres à une classe et différents de ceux de la série a, qui, lorsqu'ils sont liés à un motif de la série a ou de la série b, ne se rencontrent pas chez tous les individus le possédant. Ceci permet de présumer que la première interprétation des zones de précipitation bifurquées observées dans la réaction en milieu gélifié des sérums anti allotypiques avec les IgG et les IgM indépendemment était correcte et qu'il ne s'agissait pas de zones de précipitation simplement superposées.

Ces observations ont été complétées par l'étude du pouvoir inhibiteur des sous-unités et des fragments d'IgM et d'IgG à l'égard des propriétés précipitantes des sérums anti allotypiques vis à vis des molécules intactes. Les immunsérums anti allotypiques préparés par des injections de précipités spécifiques sont supposés dirigés essentiellement contre les motifs allotypiques des IgG. Dans le système IgG Aa1$^+$ sérum anti précipité spécifique Aa1$^+$, la sous-unité IgMs Aa1$^+$, dont il a été montré qu'elle conservait tous les déterminants allotypiques de la molécule intacte, n'inhibe la précipitation qu'à 45%, ce qui pourrait montrer que les IgG possèdent des déterminants du motif Aa1 qui paraissent manquer sur les IgMs et sur les IgM. D'autre part, dans le système IgM Aa1$^+$ sérum anti IgM Aa1$^+$, le fragment d'IgG Aa1$^+$: Fab-γ-pap dont il a été montré qu'il possédait tous les déterminants allotypiques de la molécule intacte n'inhibe la réaction de précipitation qu'à 85%. Ceci pourrait encore indiquer que les IgM semblent posséder des déterminants Aa1 qui pourraient manquer sur Fab-γ-pap et sur les IgG.

Des observations de même nature ont été rapportées par TODD et coll. (1967) qui ont montré que, dans le sérum anti Aa1 qu'ils ont examiné, tous les anticorps contre les déterminants allotypiques de Aa1 présents sur les IgG n'étaient pas capables de réagir avec ceux qui sont présents sur les IgM. En effet, ce sérum anti Aa1 épuisé par des IgM Aa1$^+$ Ab4$^+$ pouvait encore précipiter des IgG Aa1$^+$ Ab4$^+$. Cependant, la technique utilisée n'a pas permis de savoir si les déterminants qui manquent sur les IgM étaient localisés sur

les mêmes molécules d'IgG que les déterminants Aa1 communs pour les deux classes d'immunoglobulines. Par contre, grâce aux réactions en milieu gélifié qui sont à l'origine de nos observations, nous avons pu préciser ce point. De plus nous avons aussi mis en évidence des déterminants allotypiques portés par des IgM Aa1$^+$ et qui ne se trouvent pas sur les IgG Aa1$^+$, alors que TODD et coll. (1967) ont rapporté qu'ils ont pu éliminer le pouvoir inhibiteur des sérums anti Aa1 dans la neutralisation de phages par des IgM Aa1$^+$ anti phage en épuisant préalablement ces sérums anti Aa1 par des IgG Aa1$^+$; les choses se passent dans l'expérience de TODD et coll. comme si tous les anticorps qui réagissent avec des déterminants allotypiques des IgM étaient aussi en mesure de se combiner avec ceux des IgG. Les mêmes résultats ont également été obtenus par cette technique avec des sérums anti Aa2 et Anti Aa3 ce qui paraissait montrer que les IgM ne portaient pas de déterminants allotypiques qu'on ne trouve aussi sur les IgG. Mais, pour épuiser les sérums anti allotypiques, TODD et coll. (1967) ont utilisé des quantités d'IgG homologues deux fois supérieures à celles déterminées au point d'équivalence. Or nous avons observé que les effets de l'épuisement par les IgG des immunsérums permettant de déceler des déterminants allotypiques présents sur les IgM et manquant sur les IgG de même allotype étaient très différents de ceux de l'équisement par les IgM des immunsérums permettant de révéler des déterminants allotypiques propres aux IgG car absents sur les IgM de même allotype. Alors que le sérum anti précipité spécifique Aa1$^+$ épuisé par un excès d'IgM (4 fois le rapport d'équivalence) précipite toujours les IgG correspondantes, le sérum anti IgM Aa1$^+$ épuisé par un très faible excès d'IgG (1/3 de plus que le rapport d'équivalence) ne précipite plus les IgM correspondantes. Il est donc possible que TODD et coll. ne se soient pas placés dans des conditions favorables pour déceler des déterminants allotypiques des IgM qui ne se trouvent pas sur les IgG de même allotype.

IV) Sur les différences et les parentés entre certains des déterminants allotypiques du motif Aa1 portés par les IgG et les IgM.

Peut-on supposer que la réaction, qu'on a observée, de certains anticorps avec les IgG seulement ou avec les IgM seulement soit dûe à des différences de structure de même nature? On serait tenté d'attribuer la

réaction propre aux IgM à une différence légère entre les déterminants antigéniques du motif Aa1 qui sont sur les IgG et IgM, puisque l'addition d'un léger excès d'IgG à l'immunsérum anti IgM Aa1$^+$ inhibe la précipitation de cet immunsérum avec les IgM. L'inhibition d'une réaction homologue par un excès d'antigène hétérologue a été étudiée par LANDSTEINER et coll. (1940) avec des ovalbumines de plusieurs espèces d'oiseaux. Dans leurs expériences, un très grand excès d'antigène hétérologue était nécessaire pour inhiber complètement la précipitation homologue. Au contraire dans des observations plus récentes ayant trait à l'allotypie des immunoglobulines humaines étudiée au moyen d'immunsérums de singes, la réaction qui persistait après l'épuisement par un sérum humain hétérologue à l'équivalence était inhibée par un très faible excès de sérum hétérologue (OUDIN 1962). Il paraît raisonnable d'attribuer la différence entre les proportions d'antigène hétérologue nécessaires à l'inhibition à une similitude plus ou moins grande entre les déterminants antigéniques de l'antigène homologue (précipitant) et de l'antigène hétérologue (inhibiteur). Ainsi cette similitude semblerait plus grande dans le cas que nous étudions (et dans le cas de l'allotypie des immunoglobulines humaines) que dans celui des ovalbumines.

Contrairement au cas du sérum anti IgM Aa1$^+$, la précipitation du sérum anti précipité spécifique Aa1$^+$ qui peut reconnaître le motif propre aux IgG n'était pas inhibée par un excès d'IgM. Il n'est pas possible de savoir si cette différence n'est qu'une différence quantitative telle que l'effet d'inhibition par l'antigène hétérologue ne se manifeste pas parce qu'il n'a pas été possible d'atteindre un excès suffisamment grand. Même s'il en était ainsi, on pourrait au moins conclure que la similitude des déterminants allotypiques intéressés dans ce cas est plus faible que dans le cas précédent.

Un autre exemple du caractère relatif de la similitude entre le motif Aa1 des IgG et des IgM est illustré par des résultats rapportés par SEGRE et coll. (1969). Ces auteurs ont comparé l'effet inhibiteur exercé par l'addition d'IgG Aa1$^+$ et IgM Aa1$^+$ sur la formation de plages de lyse dans le système: hématies de mouton sensibilisées par des IgG Aa1$^+$, cellules de rate provenant de lapins Aa1$^-$ immunisés contre des IgG Aa1$^+$. La concentration molaire (calculée sur la base du poids moléculaire de la sous-unité d'IgM) nécessaire

pour obtenir 50% d'inhibition était 27 fois plus faible pour les IgG que pour les IgM.

V) Sur la nature des déterminants allotypiques Aa1 propres aux IgG et propres aux IgM.

La nature des déterminants allotypiques qui varient dans les spécificités allotypiques de la série a chez les IgG et les IgM peut être discutée en envisageant plusieurs hypothèses. On peut se demander à quel "niveau" de la structure (primaire, tertiaire ...) ces différences interviennent.

On pourrait attribuer par exemple les déterminants allotypiques dont les réactions indiquent la présence sur les IgG et non sur les IgM de même allotype au fait que ces déterminants sont masqués dans la molécule d'IgM dont la structure quaternaire est beaucoup plus complexe que celle des IgG. Mais les réactions qui portent sur la sous-unité IgMs ont montré que si ce masquage existe il est déjà réalisé sur cette sous-unité dont la structure se rappoche pourtant de celle des IgG. La structure de ces sous-unités est cependant encore assez différente de celle des IgG pour pouvoir entraîner un masquage de certains déterminants antigéniques puisque la chaîne lourde μ est plus longue d'1/3 que la chaîne lourde γ, et que l'arrangement des chaînes polypeptidiques paraît différent dans les IgMs et dans les IgG. En effet il a été établi par ONOUE et coll. (1965) que la molécule d'IgM peut ne posséder que 5 sites anticorps actifs; les IgMs dont le poids moléculaire et la constante de sédimentation sont voisins de ceux des IgG ne comportent qu'un site actif bien que les deux fragments (Fab-μ-try) que l'on obtient par digestion trypsique de l'IgMs aient chacun un site anticorps actif (CHAVIN et coll. 1969). Il est donc raisonnable d'imaginer qu'il s'agit du masquage d'un site anticorps dû à un arrangement particulier de la molécule d'IgMs, alors que sur la molécule d'IgG ces deux sites sont accessibles à l'antigène. Le raisonnement qui est valable pour le masquage d'un site anticorps peut s'appliquer sans doute aussi au masquage de déterminants antigéniques.

Des expériences sur les haptènes ont montré que l'environnement du déterminant antigénique avait une grande importance. Par exemple la réaction de précipitation du haptène *p*-amino-phénylarsonate couplé à une protéine avec les anticorps correspondants peut être inhibée par le haptène seul; mais elle

est inhibée plus fortement encore par le haptène couplé à de la tyrosine (LOOKER et coll. 1933). Ceci s'explique par le fait que la structure du site anticorps est complémentaire beaucoup moins de la structure du haptène seul que de la structure du haptène et de la surface de la molécule de protéine par laquelle il est immédiatement entouré. De même, ce qui, dans le motif Aa1 appartient à la structure primaire supposée semblable dans les molécules d'IgG et d'IgM Aa1$^+$ pourrait avoir un environnement différent sur les immunoglobulines des deux classes, sans que ces différences portent nécessairement sur des portions voisines de la séquence d'acides aminés.

Les différences des spécificités allotypiques de la série a selon qu'elles sont portées par les IgG ou par les IgM pourraient enfin refléter des différences de la structure primaire de ces molécules. Pour rendre compte de la présence, sur les classes d'immunoglobulines IgG, IgM, IgA, des marqueurs allotypiques Aa1, Aa2, Aa3 régis par des gènes allèles, il a été postulé dans un travail de ce laboratoire (TODD 1963) que deux gènes devaient régir la biosynthèse de deux parties différentes des mêmes chaînes lourdes d'immunoglobulines. Cette hypothèse a ensuite été précisée (LENNOX et COHN 1967): l'un des gènes gouvernerait la biosynthèse de la région dite constante qui porte les déterminants isotypiques (ceux qui distinguent les classes l'une de l'autre), et il serait différent pour chacune de ces classes; l'autre gène régirait la biosynthèse de la région dite variable qui porte des déterminants allotypiques, et il leur serait commun puisqu'on retrouve ces déterminants dans toutes les classes. En réalité s'il semble bien établi que des déterminants allotypiques de la série a font partie de la région variable des chaînes lourdes (INMAN 1967; KOSHLAND 1967; KOSHLAND et coll. 1968; PRAHL et PORTER 1968; WILKINSON 1969) et si d'autre part on sait que la structure du fragment Fc qui fait partie de la région constante est différente selon les classes d'immunoglobulines, ceci ne permet pas de conclure que les gènes de la série a régissent la structure de la totalité de la région variable, et d'elle seule. D'autre part, quoiqu'on connaisse maintenant des marqueurs allotypiques sur la région constante des chaînes lourdes, la commande génétique précise des portions de la chaîne lourde qui ne sont pas régies par les gènes de la série a n'est pas encore connue avec précision. Soit à considérer la possibilité que les détermi-

nants allotypiques qui ont été considérés jusqu'ici dans cette discussion comme faisant partie des motifs de la série a, et qui sont pourtant différents selon que ces motifs sont portés par les IgG ou par les IgM fassent partie de la structure primaire des chaînes lourdes. Cette possibilité entraîne à supposer un schéma de la commande génétique de la synthèse de ces chaînes un peu différent et plus compliqué que celui qui a été rappelé plus haut. Il faudrait en effet supposer que la portion de chaîne lourde qui porte les déterminants considérés comme faisant partie du motif Aa1 quoique différents sur les IgG et les IgM est régie par un autre gène que le gène Aa1. Puisqu'on admet que le gène Aa1 régit une partie de la chaîne lourde des IgG et des IgM, la structure primaire qui est régie par le gène est en effet nécessairement la même dans les deux classes et la structure primaire qui comprend des déterminants différents selon la classe ne peut être régie que par un autre gène. Si la coexistence de ces déterminants avec ceux du motif Aa1, qui a été observée dans un certain nombre d'individus peut être considérée comme générale, il faudrait encore conclure que ce gène est lié au locus a ou, d'une manière plus précise, au gène Aa1 d'une manière plus étroite que deux gènes quelconques observés jusqu'ici dans l'allotypie des immunoglobulines du lapin. On sait en effet que des motifs allotypiques portés par les régions constantes de chaînes lourdes d'IgG sont régis par des gènes dont la recombinaison avec le locus a n'a pas encore été observée dans des études de famille. Mais il faut bien admettre que cette recombinaison a dû se produire puisqu'un motif donné porté par la région constante s'observe à l'état homozygote avec l'un ou l'autre des motifs de la série a. D'autre part, on a vu que certains motifs allotypiques dont la localisation moléculaire n'a pas été précisée ou qui sont propres aux IgM s'observait uniquement chez des individus $Aa2^+$; mais qu'il existe des individus $Aa2^+$ chez lesquels ces motifs allotypiques ne sont pas décelés. Il faudrait ajouter que si des liaisons génétiques aussi étroites que celle qu'on a discutée ne semblent pas avoir été observées jusqu'ici chez le lapin, il en a été observé chez la souris entre les gènes qui régissent les motifs allotypiques portés par les régions constantes des différentes classes ou sous-classes de chaînes lourdes (POTTER et coll. 1967). Rien ne permet actuellement de savoir si la portion de chaîne lourde qui porte les détermi-

nants allotypiques dont il s'agit et qui serait régie par ces gènes ferait partie de la région variable ou de la région constante, ou si elle comporterait une partie de chacune de ces deux régions.

VI) Sur la non-précipitabilité des sous-unités IgMs et des fragments Fab-μ par les sérums anti allotypiques.

La recherche, au moyen de l'inhibition de la précipitation, des déterminants allotypiques sur les fragments de digestion enzymatique et les sous-unités de réduction des IgG et des IgM a confirmé l'existence de déterminants allotypiques propres aux IgG ou aux IgM déjà mis en évidence par des réactions de précipitation en milieu gélifié, et a permis de préciser leur localisation. En outre, cette étude a révélé des différences dans les propriétés précipitantes des fragments et des sous-unités d'IgG et d'IgM à l'égard des immunsérums anti allotypiques: les sous-unités IgMs des 3 allotypes de la série a ne précipitent pas avec les sérums anti allotypiques correspondants, alors que les IgG qui ont une structure voisine de celle des IgMs les précipitent; les fragments Fab-μ-try d'allotype Aa2 et Aa3 ne précipitent pas avec les sérums anti allotypiques correspondants. alors que les fragments Fab-γ-pap des mêmes allotypes qui ont une structure vraisemblablement peu différente les précipitent.

La réaction antigène anticorps se traduit généralement par l'apparition d'une précipitation qui est un phénomène complexe nécessitant que plusieurs conditions soient réunies (MARRACK 1961). Quoique la combinaison antigène anticorps soit nécessaire à la réaction de précipitation, elle n'est sans doute pas suffisante à elle seule pour en justifier l'apparition.

La non-précipitabilité des fragments ou des sous-unités que nous venons de décrire n'est certainement pas imputable aux anticorps qui interviennent dans la réaction, car un même immunsérum qui ne précipite pas ces fragments ou ces sous-unités précipite pourtant des molécules qui ont apparemment les mêmes déterminants. Il a en effet été montré dans le chapitre des résultats que l'action des enzymes ou du mercaptan n'entraîne pas en général la destruction de déterminants allotypiques sur les sous-unités et les fragments d'IgM.

En considérant les IgG et les IgM non pas du point de vue de leurs déterminants antigéniques mais de leur fonction anticorps, on pourrait trouver

une ressemblance entre ce problème et celui de la valence du site anticorps des IgM (SELA 1968); la sous-unité IgMs ne semble posséder qu'un seul site anticorps, alors que l'IgG avec laquelle on la compare souvent, en possède deux.

Si la structure des IgM et des IgG était mieux connue, il serait sans doute possible d'apporter à ces problèmes quelque solution.

VII) Sur les deux variantes de la spécificité allotypique Aa3 chez les IgG et chez les IgM.

Certains sérums anti allotypiques permettent de distinguer deux zones de précipitation en milieu gélifié lorsqu'ils réagissent avec les allotypes (de la série a ou de la série b) correspondants.

La première explication qui a été proposée de ces variantes de spécificités allotypiques est l'existence de sous-classes de chaînes peptidiques qui ne seraient pas encore connues par d'autres propriétés et dont la synthèse serait régie par des gènes étroitement liés, ces sous-classes étant semblables à celles dont l'existence et l'allotypie ont pu être étudiées chez l'homme et chez la souris grâce aux myélomes (OUDIN 1966 I et II).

Nous avons pu observer que les deux variantes de la spécificité Aa3 se manifestaient non seulement chez les IgG mais aussi chez les IgM. Ceci n'est pas surprenant si, comme il semble bien établi, les motifs allotypiques de la série a sont communs aux IgG et aux IgM (TODD 1963; STEMKE et coll. 1965). La portion de chaîne lourde qui porte les motifs de la série a et qui semble bien être leur région variable (INMAN 1967; KOSHLAND 1967; KOSHLAND et coll. 1968; PRAHL et coll. 1968; WILKINSON 1969) existerait ainsi sous forme de deux sous-classes qui sont communes et régies par les mêmes gènes, pour les IgG et les IgM (OUDIN 1968).

Ces variantes ont donc paru longtemps inséparables et elles se rencontraient toujours ensemble chez tous les individus portant la même spécificité allotypique. Cependant il a été montré que deux variantes observées avec un sérum anti Aa1 (HAMERS et coll. 1965, 1966, 1967) pouvaient être séparées au sein d'une population de lapins: certains individus pouvant n'en posséder qu'une. Il a ensuite été précisé que le motif responsable de l'une de ces variantes se trouvait sur le fragment Fc des IgG contrairement aux autres

motifs de la série a qui sont localisés sur le fragment Fab. Cette spécificité qui est donc particulière aux IgG a été appelée A8.

La présence de deux zones de précipitation dans la réaction du sérum anti Aa3 aussi bien avec la solution d'IgM que celle d'IgG est importante non seulement parce qu'elle s'accorde avec la première interprétation des zones jumelles qui a été rappelée mais aussi parce qu'elle permet d'exclure une interprétation des deux zones observées avec cet immunsérum qui serait semblable à l'interprétation donnée par HAMERS et coll. des deux zones observées par ces auteurs dans la réaction d'un sérum anti Aa1.

VIII) Sur les microimmunoglobulines

Des microimmunoglobulines du sérum humain ont été décrites à la fois chez des individus myélomateux et chez des individus normaux (WALDMANOR et coll. 1969). Chez les myélomateux il a été établi que les microimmunoglobulines les plus abondantes étaient des monomères et des dimères des chaînes légères (MORTON et coll. 1956; EDELMAN et coll. 1962; BERNIER et coll. 1964). Pour ce qui est des individus normaux, la situation est plus complexe et l'on dénombre plusieurs espèces de microimmunoglobulines qui diffèrent par leurs caractères antigéniques et physicochimiques. Les premières décrites (BERGGÅRD 1961; BERGGÅRD et coll. 1963) d'un poids moléculaire de 25.000 ont d'abord été considérées comme des chaînes légères c'est-à-dire l'équivalent, mais à une concentration beaucoup plus faible, de ce qui est rencontré chez les myélomateux. Par la suite, il a été établi que les microimmunoglobulines qui avaient des ressemblances avec les chaînes légères différaient de celles-ci par leur composition en acides aminés, principalement du point de vue du nombre de cystéines, et qu'elles représentaient très vraisemblablement le produit d'une synthèse de novo (IKENAKA et coll. 1965). L'hétérogéneité moleculaire des immunoglobulines du sérum humain qui possèdent les déterminants antigéniques des IgM a été décrite par SOLOMON (1969). On en distingue 3 sortes qui ont des constantes de sédimentation différentes: la constante de sédimentation des premières est 19S, celle des secondes est 7S, enfin les dernières sont celles qui sédimentent le plus lentement. Les molécules dont la constante de sédimentation est plus petite que 7S sont dépourvues d'une partie des déterminants des IgM et sont considérées comme un

produit de dégradation de la protéine 19S. Pour ce qui est du lapin, KUWAHARA et coll. (1966) ont observé dans des sérums anti lysozyme ou anti albumine du sérum de boeuf des immunoglobulines de constante de sédimentation 3,5S possédant un site anticorps, et qui ressemblaient beaucoup à des chaînes lourdes γ.

Nous avons étudié dans cet exposé une fraction de protéines sériques dont le poids moléculaire moyen pouvait être estimé à 45.000 et qui contenait des constituants possédant des déterminants antigéniques des chaînes légères, des fragments Fd et Fc des chaînes γ et du fragment Fd des chaînes μ. Les microimmunoglobulines portant les déterminants antigéniques des IgG peuvent être divisées en deux catégories moléculaires distinctes: celles qui possèdent tous les déterminants des fragments Fab et eux seuls et celles qui portent des déterminants du fragment Fc sans qu'il soit possible de dire si elles ont aussi des déterminants de Fab.

Nous n'avons pas d'éléments pour déterminer si ces microimmunoglobulines sont des molécules intactes et par conséquent différentes des immunoglobulines connues jusqu'ici, ou bien si elles sont des produits de dégradation de molécules plus importantes. Si elles sont les produits d'une dégradation réalisée in vivo, on peut remarquer que les fragments Fab d'IgG, contrairement aux fragments Fc, sont connus pour être très vite éliminés de la circulation. Les microimmunoglobulines portant les déterminants du fragment Fab auraient donc des chances d'être différentes de ce fragment. L'absence de déterminants antigéniques du fragment Fc des IgM sur les microimmunoglobulines que nous avons décrites peut être rapprochée de ce qui est relatif à la fragilité de ce fragment selon que l'action enzymatique est tentée sur la molécule d'IgM intacte ou sur ses sous-unités. L'extrémité C-terminale de la chaîne μ est difficile à dégrader dans la molécule native alors qu'elle est très fragile dans la sous-unité (MILLER et coll. 1966; ONOUE et coll. 1967, MIHAESCO et coll. 1969).

Il n'a pas été possible de mettre la fonction anticorps en évidence avec des microimmunoglobulines du sérum de lapins anti hématies de mouton.

Pour ce qui est des spécificités allotypiques, les microimmunoglobulines conservent des propriétés précipitantes à l'égard des sérums anti Aa2 et anti

Ab4; elles ont seulement des propriétés inhibitrices vis à vis des sérums anti Aa1 et anti Aa3. En supposant que ces microimmunoglobulines sont un mélange de fragments qui ressemblent aux fragments Fab-γ et Fab-μ obtenus par digestion enzymatique des IgG et des IgM, on a comparé les propriétés de ces fragments et des microimmunoglobulines à l'égard des sérums anti Aa1 et anti Aa3. Les fragments Fab-γ et Fab-μ d'allotype Aa1 ne précipitent pas l'immunsérum correspondant; donc le mélange des deux ne le précipite pas; les microimmunoglobulines ne le précipitent pas non plus. Le fragment Fab-γ d'allotype Aa3 précipite l'immunsérum correspondant tandis que Fab-μ de même allotype, qui ne précipite pas, peut inhiber cette réaction de précipitation; le mélange de ces deux fragments dans des proportions qui ont été détaillées dans le chapitre des résultats peut ne plus précipiter le sérum anti Aa3; les microimmunoglobulines ne le précipite pas non plus. Le sérum anti Ab4 qui permet de reconnaître deux variantes des motifs allotypiques Ab4 portées par des molécules différentes a permis, au cours de l'analyse immunoélectrophorétique d'une solution de microimmunoglobulines, de distinguer deux arcs de précipitation séparés. Il se pourrait donc que les molécules qui portent les variantes de ce motif allotypique aient des propriétés physicochimiques différentes, ce qui ne semble pas avoir été observé jusqu'ici.

RESUME

Une spécificité allotypique est une spécificité antigénique qui n'est pas la même dans des groupes différents d'individus de la même espèce pour une protéine donnée. Les sept principales spécificités allotypiques des immunoglobulines de lapin, qui sont communes aux IgG et aux IgM sont régies par 7 gènes qui se distribuent en deux séries, a et b, de 3 allèles et 4 allèles respectivement. D'autres spécificités allotypiques sont propres à l'une ou l'autre des classes d'immunoglobulines. Dans nos expériences, les spécificités allotypiques portées par les IgG et les IgM ont été étudiées et comparées.

Les IgM qui ne sont qu'une minorité des immunoglobulines dans les sérums normaux peuvent être augmentées notablement par l'infection par *Trypanosoma equiperdum.* Nous nous sommes servi de ce moyen pour améliorer les conditions expérimentales en augmentant la concentration des IgM.

Nous avons observé à notre tour que les IgM peuvent posséder des spécificités qui leur sont propres et qui sont différentes de celles de la série a, et aussi que les spécificités allotypiques de la série a peuvent présenter des différences selon qu'elles sont portées par les IgM ou par les IgG.

Dans un mélange de sérums trypanosomés, nous avons pu mettre en évidence des spécificités allotypiques propres aux IgM et différentes des spécificités de la série a. Dans les réactions de précipitation en milieu gélifié de la fraction de macroglobulines de ce mélange avec des immunsérums préparés pour réagir avec les trois allotypes de la série a, ces spécificités allotypiques propres aux IgM se manifestaient par des zones de précipitation distinctes de celles qui étaient caractéristiques des motifs allotypiques de la série a. Les mêmes sérums anti allotypiques, épuisés par les IgG, ont permis une recherche systématique des motifs propres aux IgM dans un certain nombre de sérums normaux pris au hasard. Il semble que le motif allotypique propre aux IgM avec lequel réagissaient les deux sérums anti Aa1 et anti Aa2 soit le même. Il a été observé que ce motif allotypique ne se rencontrait que dans des sérums $Aa2^+$ sans pourtant être décelé dans tous les sérums $Aa2^+$.

Les spécificités allotypiques de la série a selon qu'elles sont portées par les IgM et les IgG peuvent présenter de légères différences. Ces différences ont été révélées par la réaction de précipitation en milieu gélifié et elles ont indiqué, dans les spécificités allotypiques Aa1 et Aa3, l'existence de déterminants qui, portés par les IgM, manquent sur les IgG, et l'existence de déterminants qui, portés par les IgG, manquent sur les IgM.

Cette comparaison a été complétée par une étude des propriétés précipitantes et inhibitrices des sous-unités et des fragments des IgG et des IgM à l'égard de la précipitation des protéines intactes par les sérums anti allotypiques. Les sous-unités de constante de sédimentation 8S préparées par réduction douce des IgM (IgMs) et les fragments Fab préparés par digestion des IgM (Fab-μ) des 3 allotypes de la série a ne sont pas précipités par les immunsérums anti allotypiques correspondants; les fragments Fab préparés par digestion des IgG (Fab-γ) d'allotype Aa1 ne sont pas précipités non plus, tandis que les fragments Fab-γ $Aa2^+$ et $Aa3^+$ le sont. L'IgMs qui possède tous les déterminants de la molécule intacte d'IgM ne semble pas posséder les déterminants propres aux IgG; le fragment Fab-γ qui possède tous les déterminants de la molécule intacte d'IgG ne semble pas posséder les déterminants propres aux IgM.

Une étude de la répartition, dans un échantillon de population, des déterminants allotypiques qui, quoique faisant apparemment partie du motif Aa1, sont propres aux IgG ou aux IgM, a montré que l'existence de ces déterminants était étroitement liée à la fois à celle de la spécificité allotypique Aa1 et de la spécificité isotypique de la classe considérée.

Pour ce qui est des familles de spécificités allotypiques, nous avons montré dans ce travail que la spécificité allotypique Ab4 se manifestait par deux variantes dans les IgG et dans les IgM. Les deux variantes de la spécificité allotypique Aa3 ont été observées elles aussi non seulement dans les IgG mais aussi dans les IgM. Une des deux variantes du motif Aa3 présente pourtant certaines différences selon que l'on considère les IgG ou les IgM.

Dans la fraction des constituants sériques dont le poids moléculaire est environ 45.000 ont été trouvées les spécificités allotypiques de la série a et de la série b en même temps que les spécificités isotypiques des IgG et des

IgM. Des réactions de précipitation nous ont montré que certains constituants de cette fraction portaient des déterminants isotypiques de la chaîne légère, des portions Fd et Fc de la chaîne γ et de la portion Fd de la chaîne μ. Les spécificités allotypiques n'ont pas toujours été décelées par des réactions de précipitation mais quelquefois par inhibition de la précipitation des sérums anti allotypiques avec les IgG ou avec les IgM.

L'analyse immunoélectrophorétique de la fraction des microimmunoglobulines a montré que leurs mobilités électrophorétiques correspondaient à celles des globulines β et γ, et qu'elles donnaient avec le sérum anti Ab4 deux arcs de précipitation dont les mobilités électrophorétiques étaient légèrement différentes; ceci a suggéré que les molécules qui portent les variantes du motif Ab4 diffèrent par certaines de leurs propriétés physicochimiques.

La nature de ces microimmunoglobulines (produits de dégradation ou molécules intactes) n'a pas été établie.

BIBLIOGRAPHIE

AMIRAIAN K., LEIKHIM E.J., 1961. Interaction of fragment III of rabbit gamma globulin and guinea pig complement. Proc. Soc. Biol. Med., 108, 454-457.

BERGGÅRD I., 1961. On a γ-globulin of low molecular weight in normal human plasma and urine. Clin. Chim. Acta, 6, 545-549.

BERGGÅRD I., EDELMAN G.M., 1963. Normal counterparts to Bence-Jones proteins: free L polypeptide chains of human γ-globulin. Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 330-337.

BERGGÅRD I., PETERSON P., 1967. Immunoglobulin components in normal human urine. Nobel Symposium 3 Gamma globulins, 71-80.

BERNIER G.M., PUTNAM F.W., 1964. Polymerism, Polymorphism and impurities in Bence-Jones proteins. Biochim. Biophys. Acta, 86, 295-308.

BRAMBELL F.W.R., HEMMINGS W.A., OAKLEY C.L., PORTER R.R., 1960. The relative transmission of the fractions of papain hydrolysed homologous γ-globulin from the uterine cavity to the foetal circulation in the rabbit. Proc. Roy. Soc. B, 151, 478-482.

Bull. World Health Organ., 1964, 30, 447-450.

BURSTEIN M., SAMAILLE J., 1957. Sur la précipitation sélective des β-lipoprotéines du sérum par l'héparine et les héparinoïdes de synthèse en présence du Cl_2Ca. J. Physiol. 49, 83-86.

CHAVIN S.I., FRANKLIN E.C., 1969. Studies on antigen-binding activity of macroglobulin antibody subunits and their enzymatic fragments. J. Biol. Chem., 244, 1345-1352.

CHESEBRO B., SVEHAG S.E., 1968. Precipitation of human serum proteins by polyethylene glycole. Clin. Chim. Acta, 20, 527-529.

CONWAY T.P., DRAY S., LICHTER E.A., 1969 I. Identification and genetic control of three rabbit γ-A immunoglobulin allotypes. J. Immunol., 102, 544-554.

CONWAY T.P., DRAY S., LICHTER E.A., 1969 II. Identification and genetic control of the f4 and f5 rabbit γA immunoglobulin allotypes. Pheno-

groups at the f locus. J. Immunol., 103, 662-667.

DEUTSCH H.F., MORTON G.I., 1957. Dissociation of human serum macroglobulins. Science, 125, 600-601.

DUBISKI S., MULLER P.J., 1967. A new allotypic specificity (Ab9) of rabbit immunoglobulin. Nature, 214, 696-697.

DUBISKI S., 1969. Immunochemistry and genetics of a "new" allotypic specificity Ae14 of rabbit γG immunoglobulins: recombination in somatic cells. J. Immunol., 103, 120-128.

DRAY S., DUBISKI S., KELUS A., LENNOX E.S., OUDIN J., 1962. A notation for allotypy. Nature, 195, 785-786.

EDELMAN G.M., GALLY J.A., 1962. The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal γ-globulins. J. Exp. Med., 116, 207-227.

EDELMAN G.M., GALLY J.A., 1964. A model for the 7S antibody molecule. Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 846-853.

EDELMAN G.M., GALL W.E., WAXDAL M.J., KONIGSBERG W.H., 1968. The covalent structure of a human γ-G-immunoglobulin. I. Isolation and characterization of the whole molecule, the polypeptide chains and tryptic fragments. Biochem., 7, 1950-1958.

EDELMAN G.M., GALL W.E., 1969. The antibody problem. Ann. Rev. Biochem., 38, 415-466.

FEINSTEIN A., 1963. Character and allotypy of an immune globulin in rabbit colostrum. Nature, 199, 1197-1199.

FLEISCHMAN J.B., PAIN R.H., PORTER R.R., 1962. Reduction of γ globulins. Arch. Biochem. Biophys., Suppl. 1, 174-184.

FLEISCHMAN J.B., PORTER R.R., PREIS E.M., 1963. The arrangement of the peptide chains in γ globulin. Biochem. J., 88, 220-228.

FOUGEREAU M., EDELMAN G.M., 1965. Corroboration of recent models of the γG immunoglobulin molecule. J. Exp. Med. 121, 373-391.

HABER E., STONE M., 1967. Extensive degradation of antibody by pepsin. Biochem., 6, 1974-1980.

HAMERS R., HAMERS-CASTERMAN C., 1965. Molecular localization of A chain allotype specificities in rabbit IgG (7S γ globulin).

J. Mol. Biol., 14, 288-289.

HAMERS R., HAMERS-CASTERMAN C., LAGNAUX S., 1966. A new allotype in the rabbit linked with As1 which may characterize a new class of IgG. Immunol., 10, 399-408.

HAMERS R., HAMERS-CASTERMAN C., 1967. Evidence for the presence of the Fc allotypic marker As8 and the Fd allotypic marker As1 in the molecules of rabbit IgG. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology XXXII Antibodies, 129-132.

HARBOE M., 1959. Quantitative studies on the hemagglutination inhibition reaction for determination of the Gm types. Acta Path. Micro. Scand., 47, 199-208.

IKENAKA T., GITLIN D., SCHMID K., 1965. Preparation and characterization of the low molecular weight human plasma 3S γ_1 globulins. J. Biol. Chem., 240, 2868-2876.

INMAN J.K., 1967. Differences in amino acid composition associated with allotypic specificities of rabbit γG immunoglobulin Fd fragments. Fed. Proc., 26, 477.

KABAT E.A., 1954. Some configurational requirements and dimentions of the combining site on an antibody to a naturally occurring antigen. J. Am. Chem. Soc., 76, 3709-3713.

KELUS A.S., 1963. γ globulin allotypes in the rabbits. Biochem. J., 88, 4P.

KELUS A.S., GELL P.G.H., 1965. An allotypic determinant specific to rabbit macroglobulin. Nature, 206, 313-314.

KELUS A.S., 1967. Rabbit allotypic markers as a model for molecular immunology. Nobel Symposium, 3, Gamma globulins, 329-339.

KOSHLAND M.E., 1967. Localization of specificity and allotypic amino acid residues in antibody Fd fragments. Cold Spring Harbor Symposia XXXII. Antibodies, 119-127.

KOSHLAND M.E., REISFELD R.A., DRAY S., 1968. Difference in amino acid composition related to allotypic and antibody specificity of rabbit IgG heavy chains. Immunochem., 5, 471-483.

KUWAHARA O., SHINKA S., IMANISHI M., MIYAGAWA N., MORI T., AMANO T., 1966. Low Molecular weight 3.5S antibodies in rabbit

antisera. Biken Journal, 9, 1-18.

LAMM M.E., SMALL P.A., 1966. Polypeptide chain structure of rabbit immunoglobulins. II. γM immunoglobulin. Biochem., 5, 267-276.

LANDSTEINER K., van der SCHEER J., 1940. On cross reactions of egg albumin sera. J. Exp. Med., 71, 445-454.

LENNOX E.S., COHN M., 1967. Immunoglobulins. Ann. Rev. Biochem., 36, 365-406.

LEVY H.B., SOBER H.A., 1960. A simple chromatographic method for preparation of gamma globulin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 103, 250-252.

LOOKER S.B., BOYD W.C., 1933. The existence of antigenic determinants of diverse specificity in a single protein. I. Tryrosin- and histidin-diazo-arsanilic acids as haptens. J. Immunol. 25, 61-69.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.

MANDY W.J., FUDENBERG H.H., LEWIS F.B., 1965. A new serum factor in normal rabbits. I. Identification and characterization. J. Immunol., 95, 501-509.

MANDY W.J., TODD C.W., 1968. Allotypy of rabbit immunoglobulin: an agglutinating specificity. Vox Sang., 14, 264-270.

MARLER E., NELSON C.A., TANFORD C., 1964. The polypeptide chains of rabbit γ globulin and its papain-cleaved fragments. Biochem., 3, 279-284.

MARRACK J.R., 1961. Incomplete antibodies. dans Immunochemical approaches to problems in microbiology, Rutgers University Press, New Brunswick, N.J. 43-48.

MASUDA T., KURIBAYASHI K., HANAOKA M., 1968. A new allotypic antigen of rabbit colostral γA immunoglobulin. J. Immunol., 102, 1156-1162.

MATTERN P., DURET J., PAUTRIZEL R., 1963. Hyper-β-macroglobulinémie au cours de la trypanosomose expérimentale du lapin à Trypanosoma equiperdum. Compt. Rend. Acad. Sci., 256, 820-822.

MERLER E., KARLIN L., MATSUMOTO S., 1968. The valency of human γM immunoglobulin antibody. J. Biol. Chem., 243, 386-390.

MIHAESCO C., SELIGMANN M., 1969. Papain digestion fragments of human IgM globulins. J. Exp. Med., 127, 431-453.

MILLER F., METZGER H., 1965. Characterization of a human macroglobulin. II. Distribution of the disulfide bonds. J. Biol. Chem., 240, 4740-4745.

MILLER F., METZGER H., 1966. Characterization of a human macroglobulin. III. The products of tryptic digestion. J. Biol. Chem., 241, 1732-1740.

MORTON J.I., DEUTSCH H.F., 1956. Demonstration of a marked Bence-Jones proteinemia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 93, 402-407.

NISONOFF A., WOERNLY D.L., 1959. Effect of hydrolysis by papain on the conbining sites of an antibody. Nature, 183, 1325-1326.

ONOUE K., YAGI Y., GROSSBERG A.L., PRESSMAN D., 1965. Number of binding sites of rabbit macroglobulin antibody and its subunits. Immunochem., 2, 401-415.

ONOUE K., KISHIMOTO T., YAMAMURA Y., 1967. Papain fragmentation of the subunits of human macroglobulin. J. Immunol., 98, 303-313.

ONOUE K., GROSSBERG A.L., YAGI Y., PRESSMAN D., 1968. Immunoglobulin M antibodies with ten combining sites. Science, 162, 574-576.

OUDIN J., 1946. Méthode d'analyse immunochimique par précipitation spécifique en milieu gélifié. Compt. Rend. Acad. Sci., 222, 115-116.

OUDIN J., 1955. L'analyse immunochimique par la méthode des gels. Moyens et techniques d'identification des antigènes. Ann. Inst. Pasteur, 89, 531-555.

OUDIN J. 1956 I. Réaction de précipitation spécifique entre des sérums d'animaux de même espèce. Compt. Rend. Acad. Sci., 242, 2489-2490.

OUDIN J., 1956 II. L' "Allotypie" de certains antigènes protéidiques du sérum. Compt. Rend. Acad. Sci., 242, 2606-2608.

OUDIN J., 1960 I. L'allotypie de certains antigènes protéidiques du sérum. Relations immunochimiques et génétiques entre six des principaux allo-

types observés dans le sérum de lapin. Compt. Rend. Acad. Sci., 250, 770-772.

OUDIN J., 1960 II. Allotypy of rabbit serum proteins. I. Immunochemical analysis leading to the individualization of seven main allotypes. J. Exp. Med., 112, 107-124.

OUDIN J., 1960 III. Allotypy of rabbit serum proteins. II. Relationships between various allotypes: their common antigenic specificity, their distribution in a sample population; genetic implications. J. Exp. Med., 112, 125-142.

OUDIN J., 1962. L'allotypie des globulines γ chez l'homme. Compt. Rend. Acad. Sci., 255, 1164-1166

OUDIN J., 1963. L'allotypie. Bull. Assoc. Anciens Elèves Inst. Pasteur, 17, 252-265.

OUDIN J., MICHEL M., 1963. Une nouvelle forme d'allotypie des globulines γ du sérum de lapin apparemment liée à la fonction et à la spécificité anticorps. Compt. Rend. Acad. Sci., 257, 805-808.

OUDIN J., 1966 I. Genetic regulation of immunoglobulin synthesis. J. Cell. Physiol., 67, suppl. 1, 77-108.

OUDIN J., 1966 II. The genetic control of immunoglobulin synthesis. Proc. Roy. Soc. B., 116, 207-219.

OUDIN J., 1968. L'hétérogéneité des immunoglobulines telle qu'elle est révélée par leurs trois sortes de spécificités antigéniques: isotypiques, allotypiques et idiotypiques. Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 965-990.

OUDIN J., MICHEL M., 1969 I. Idiotypy of rabbit antibodies. I. Comparison of idiotypy of antibodies against Salmonella typhi with that of antibodies against other bacteria in the same rabbits, or of antibodies against Salmonella typhi in various rabbits. J. Exp. Med., 130, 595-617.

OUDIN J. MICHEL M., 1969 II. Idiotypy of rabbit antibodies. II. Comparison of idiotypy of various kinds of antibodies formed in the same rabbits against Salmonella typhi. J. Exp. Med., 130, 619-642.

OVARY Z., KARUSH F., 1961. Studies on the immunologic mechanism of anaphylaxis. II. Sensitizing and combining capacity in vivo of

fractions separated from papain digests of antihapten antibody. J. Immunol., 86, 146-150.

PAUTRIZEL P., LAFAYE A., DURET J., 1959. Anticorps et modifications plasmiques au cours de la trypanosomose expérimentale du lapin par Trypanosoma equiperdum. Rev. Immunol., 23, 323-335.

PORTER R.R., 1958. Separation and isolation of fractions of rabbit gamma globulin containing the antibody and antigenic combining sites. Nature, 182, 670-671.

PORTER R.R., 1959. The hydrolysis of rabbit γ-globulin antibodies with crystalline papain. Biochem. J., 73, 119-126.

PORTER R.R., 1960. γ globulin and antibodies. dans The plasma proteins, Academic Press, New York, 1, 241-277.

POTTER M., LIEBERMAN R., 1967. Genetics of immunoglobulins in the mouse. Adv. Immunol., 7, 91-145.

PRAHL J.W., PORTER R.R., 1968. Allotype related sequence variation of the heavy chain of rabbit immunoglobulin G. Biochem. J., 107, 753-763.

SCHEIDEGGER J.J., 1955. Micro-méthode d'immuno-électrophorèse. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 7, 103.

SCHROHENLOHER R.E., BARRY C.B., 1968. Ultra-centrifugal studies of the reaction of IgM anti γ globulin subunits with human IgG. J. Immunol., 100, 1006-1013.

SEGRE M., SEGRE D., INMAN F.P., 1969. Comparison of Aa1 allotypic specificity carried by rabbit IgG and IgM. J. Immunol., 102, 1368-1372.

SELA M., 1968. Antibodies: shape, homogeneity and valency. FEBS Letters, 1, 83-85.

SELL S., 1966. IgM allotypes of the rabbit: identification of a second specificity. Science, 153, 641-643.

SMALL P.A., LAMM M.E., 1966. Polypeptide chain structure of rabbit immunoglobulins. I. γG immunoglobulin. Biochem., 5, 259-266.

SOLOMON A., 1969. Molecular heterogeneity of immunoglobulin M (γM-globulin). J. Immunol., 102, 496-506.

STEMKE G.W., 1963. Immunochemistry of rabbit γ-globulin and its papain-produced fragments. Ph. D. Thesis, University of Illinois.

STEMKE G.W., 1964. Allotypic specificity of A- and B- chains of rabbit gamma globulin. Science, 145, 403-405.

STEMKE G.W., FISHER R.J., 1965. Rabbit 19S antibodies with allotypic specificities of the a locus group. Science, 150, 1298-1303.

SUZUKI T., DEUTSCH H.F., 1967. Dissociation, reaggregation, and subunit structure studies of some human γM globulins. J. Biol. Chem., 242, 2725-2738.

SUZUKI T., 1969. Enzymic cleavage of human γM globulins and their 8S subunits. Immunochem., 6, 587-608.

TARANTA A., FRANKLIN E.C., 1961. Complement fixation by antibody fragments. Science, 134, 1981-1982.

TODD C.W., 1963. Allotypy in rabbit 19S protein. Biochem. Biophys. Res. Commun., 11, 170-175.

TODD C.W., INMAN F.P., 1967. Comparison of the allotypic combining sites on H chains of rabbit IgG and IgM. Immunochem., 4, 407-417.

WALDMANOR T.A., STROBER W., 1969. Metabolism of immunoglobulins. Progress in Allergy, 13, 1-110.

WALLER M., RICHARD A.J., MALLORY J., 1969. Immunochemical and serological studies of enzymatically fragmented human IgG globulin. II. Hydrolysis with subtilisin, elastase, trypsin and chymotrypsin. Immunochem., 6, 207-214.

WILHEIM E., LAMM M.E., 1966. Absence of allotype b4 in the heavy chains of rabbit γG immunoglobulin. Nature, 212, 846-847.

WILKINSON J.M., 1969. Variation in the N-terminal sequence of heavy chains of immunoglobulin G from rabbits of different allotype. Biochem. J., 112, 173-185.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Synthèse des immunoglobulines par des myélomes in vitro.

Vu et approuvé

Paris, le 1 Juin 1970

Le Doyen de la Faculté des Sciences
de Paris

Luc GAUTHIER

Vu
et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

R. MALLET